

UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS

FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA

E.A.P. DE MEDICINA VETERINARIA

**Comparación de tres programas de vacunación
contra la Laringotraqueítis Infecciosa Aviar
usando una vacuna inactivada en pollos de engorde**

TESIS

Para optar el título profesional de Médico Veterinario

AUTOR

Ofelia Juana Alzamora Pinao

Lima – Perú

2015

DEDICATORIAS

A Dios por ser mi único fundamento

A mis padres, Arcenio y Jovita, que son mis grandes amores y mis ejemplos de vida, mi eterna gratitud y admiración.

A mis hermanos y sobrinos que con su amor, paciencia y apoyo son mi inspiración para ser mejor cada día.

A mis abuelos: Eleuterio, Francisco, Valentina y Natalia, que sus enseñanzas de empeño y perseverancia tras nuestros sueños perduran en nuestra familia.

A Eliana Icochea que es más que maestra como una segunda madre, por ser mi mejor ejemplo a seguir como profesional y persona.

A mis profesores: Rosita G., Mónica A., Pablo R., Hermelinda R., Nieves S., Rosa P, Wilfredo H, Víctor F., Diego D., Milder A., César G., que me enseñaron a amar nuestra profesión.

A Cynthia M., Rebeca C., Edgar V., Milagros Z., Luis S. y Rodolfo V. por ser amigos incondicionales y estímulo de superación.

A las amistades y colegas que me apoyaron en la realización de esta tesis.

ÍNDICE DE CONTENIDO

RESUMEN	iv
ABSTRACT	v
LISTA DE TABLAS	vi
LISTA DE FIGURAS	vii
LISTA DE APÉNDICES	viii
I. INTRODUCCIÓN	1
II. REVISIÓN DE LA LITERATURA	3
2.1. Etiología	3
2.1.1. Clasificación del agente etiológico	3
2.1.2. Morfología del agente etiológico	3
2.1.3. Replicación viral	5
2.1.4. Latencia viral	6
2.1.5. Persistencia del virus en el medio ambiente	7
2.2. Epidemiología de Laringotraqueitis infecciosa aviar	8
2.2.1. Distribución geográfica	8
2.2.2. Hospedadores	9
2.2.3. Transmisión	9
2.2.4. Factores de riesgo	10
2.2.5. Laringotraqueitis infecciosa aviar en el Perú	10
2.3. Patogénesis de la infección con Laringotraqueitis infecciosa aviar	11
2.4. Sintomatología clínica	13
2.5. Lesiones.....	14
2.5.1. Lesiones macroscópicas.....	14
2.5.2. Lesiones microscópicas	15
2.6. Desarrollo de inmunidad contra Laringotraqueitis infecciosa aviar	16

2.7. Diagnóstico de Laringotraqueitis infecciosa aviar	17
2.7.1. Aislamiento viral	17
2.7.2. Examen de histopatología	18
2.7.3. Inmunofluorescencia directa	19
2.7.4. Inmunofluorescencia indirecta	19
2.7.5. Inmunodifusión en agar gel (AGID)	19
2.7.6. Virus neutralización	20
2.7.7. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)	20
2.7.8. Inmunoabsorbancia ligada a enzima (ELISA)	21
2.8. Diagnóstico diferencial.....	21
2.9. Prevención y control de la enfermedad	22
2.9.1. Vacunación	23
2.9.2. Estrategias de control	28
2.10. Erradicación	28
III. MATERIALES Y MÉTODOS	30
3.1. Lugar de estudio	30
3.2. Animales.....	30
3.3. Alimentación de las aves	30
3.4. Diseño experimental	31
3.4.1. Tratamientos	31
3.4.2. Desafío viral	31
3.4.3. Parámetros para la evaluación de signos clínicos post-desafío	32
3.4.4. Parámetro para la evaluación de lesiones macroscópicas post-desafío	33
3.5. Análisis de datos	34
IV. RESULTADOS	35
4.1. Parámetros productivos	35

4.1.1. Peso corporal	35
4.1.2. Ganancia de peso	35
4.2. Evaluación de signos clínicos	37
4.2.1. Ronqueras	37
4.2.2. Estornudos	37
4.2.3. Conjuntivitis	38
4.3. Evaluación de las lesiones macroscópicas	39
4.3.1. Laringitis	39
4.3.2. Lesiones en coanas	39
4.3.3. Mucosidad en tráquea	40
4.3.4. Hemorragia en tráquea	40
4.3.5. Sacos aéreos.....	41
V. DISCUSIÓN.....	42
VI. CONCLUSIONES	46
VII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICA	47
VIII. APÉNDICE	54

RESUMEN

El objetivo del estudio fue evaluar la protección contra el virus de Laringotraqueítis Infecciosa Aviar (ILT), mediante el uso de una vacuna inactivada en pollos de engorde. Se evaluaron 180 pollos de engorde de la línea Cobb Vantress, machos de 1 día de edad, distribuidos en los cuatro grupos: T1: aves vacunadas al día 1 de edad; T2: aves vacunadas al día 12 de edad; T3: aves vacunadas al día 1 y al día 12 de edad; T4: aves control sin vacuna. Cada tratamiento estuvo conformado por 45 aves con tres repeticiones de 15 animales. El desafío viral con una cepa de campo de ILT se realizó a los 30 días de edad. A los días 4, 6, 8, 10, 12 y 14 fueron evaluados los signos clínicos post-desafío: ronquera, estornudos y conjuntivitis. Asimismo los días 7, 11 y 17 post-desafío, se realizaron necropsias en 4 aves por tratamiento para evaluación de lesiones macroscópicas en laringe, tráquea y sacos aéreos. Los resultados del estudio indicaron que las aves de los grupos vacunales presentaron una menor frecuencia de signos respiratorios en comparación al grupo control ($p<0.05$), indicando además que las aves con doble vacunación (al día 1 y 12 de edad) presentaron la menor frecuencia de signos clínicos. Las aves del T3 (con doble vacunación) presentaron el menor grado de lesiones en tráquea, laringe y coanas comparado con el control y los demás tratamientos, mostrando menor grado de mucosidad y hemorragias en la tráquea, aunque sin diferencias significativas ($p>0.05$). Las aves del T3 no presentaron lesiones en sacos aéreos mostrando diferencias significativas ($p<0.05$) al día 7, con respecto al resto de grupos. Los resultados indican que en pollos de engorde la doble vacunación con una vacuna inactivada contra ILT al día 1 y 12 ofrece mejor protección que una vacunación con una sola dosis.

Palabras clave: Laringotraqueítis, pollos, vacunación

ABSTRACT

The aim of the study was to evaluate the protection against avian infectious laryngotracheitis virus (ILT) through only the use of an inactivated vaccine in broilers. We evaluate 1 day of age-180 male broilers of Cobb Vantress line, divided into four groups, T1: vaccinated at day 1 of age; T2: vaccinated at day 12; T3: vaccinated at day 1 and at day 12; T4: control group without vaccination. Each treatment consisted of 45 birds with three replicates of 15 animals. The viral challenge with wild-type ILT strains was done at 30 days old. At days 4, 6, 8, 10, 12 and 14 post-challenge were evaluated clinical signs: hoarseness, sneezing and conjunctivitis. Also on 7, 11 and 17, post-challenge necropsies were done in 4 birds per treatment for evaluation of macroscopic lesions in the larynx, trachea and air sacs. The study results indicated that the vaccinated groups had a lower frequency of respiratory signs in comparison to the control group ($p < 0.05$), further indicating that birds with double vaccination (day 1 and 12 years old) had the lowest frequency of clinical signs. The birds in the T3 group (double vaccination) had the least extensive damage to the trachea, larynx and nares compared to control and other treatments, showing lesser degree of bleeding and mucus in the trachea, but without significant differences ($p > 0.05$). The birds of T3 had no air sac lesions showing significant differences ($p < 0.05$) at day 7, compared to other groups. The results indicate that the double broiler vaccination with inactivated vaccine against ILT in day 1 and day 12 provides better protection than one-dose vaccination.

Keywords: laryngotracheitis, chickens, vaccination

LISTA DE TABLAS

Tabla 1.	Taxonomía y enfermedades ocasionadas por Herpesvirus aviares	Pág. 4
Tabla 2.	Duración de la viremia y células blanco en Herpesviridae	Pág. 12
Tabla 3.	Descripción de tratamientos	Pág. 31
Tabla 4.	Cronograma de actividades del estudio	Pág. 32
Tabla 5.	Clasificación de signos respiratorios	Pág. 32
Tabla 6.	Clasificación de la presencia de estornudos	Pág. 32
Tabla 7.	Clasificación de la presencia de conjuntivitis	Pág. 32
Tabla 8.	Clasificación de las lesiones en coanas	Pág. 33
Tabla 9.	Clasificación de las lesiones en laringe	Pág. 33
Cuadro 10.	Clasificación de las lesiones en tráquea	Pág. 33
Tabla 11.	Clasificación de las lesiones en sacos aéreos	Pág. 34

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.	Morfología de un virión de Herpesvirus	Pág. 5
Figura 2.	Representación de los pesos promedios semanales para cada tratamiento	Pág. 36
Figura 3.	Representación de las ganancias de pesos semanales para cada tratamiento	Pág.36
Figura 4.	Representación de la frecuencia de ronquera según tratamientos	Pág. 37
Figura 5.	Representación de la frecuencia de estornudos según tratamientos	Pág. 38
Figura 6.	Representación de la frecuencia de conjuntivitis según tratamientos	Pág. 39

LISTA DE APÉNDICE

Apéndice I.	Valores estadísticos (promedio, medianas) en aves durante las semanas de estudio	Pág. 55
Apéndice II.	Presentación de ronqueras en aves post-desafío viral	Pág. 56
Apéndice III.	Presentación de estornudos en aves post-desafío viral	Pág. 56
Apéndice IV.	Presentación de conjuntivitis en aves post-desafío viral	Pág. 56
Apéndice V.	Presentación de score de lesiones en laringe de aves post-desafío viral	Pág. 57
Apéndice VI.	Presentación de lesiones en las coanas de aves post-desafío viral	Pág. 57
Apéndice VII.	Presentación del score de mucosidad en aves post-desafío viral	Pág. 57
Apéndice VIII.	Presentación de score de lesiones hemorrágicas en tráqueas de aves post-desafío	Pág. 58
Apéndice IX.	Presentación de score de lesiones en sacos aéreos de aves post-desafío viral	Pág. 58
Apéndice X.	Evaluación del grado de mucosidad en aves control (superior izquierda), T1 (superior derecha), T2 (inferior izquierda) y T3 (inferior derecha).	Pág. 58
Apéndice XI.	Evaluación del grado de aerosaculitis en aves control (superior izquierda), T1 (superior derecha), T2 (inferior izquierda) y T3 (inferior derecha)	Pág. 59
Apéndice XII.	Evaluación de la mucosidad y hemorragias en aves control (superior izquierda), T1 (superior derecha), T2 (inferior izquierda) y T3 (inferior derecha)	Pág. 59

I. INTRODUCCIÓN

La Laringotraqueitis infecciosa aviar (LTI) es una enfermedad viral, altamente contagiosa y persistente en los sistemas de producción avícola a nivel mundial. La enfermedad es ocasionada por un Herpesvirus tipo I y se caracteriza clínicamente por la presencia de signos clínicos como tos, disnea, depresión, conjuntivitis y presencia de exudado sanguinolento entre otros (Gerlach, 1994; Sellers *et al.*, 2004). La enfermedad ocasiona además un descenso en los parámetros productivos en aves de engorde y de postura, produciendo grandes pérdidas económicas (OIE, 2008). Es una enfermedad de declaración obligatoria a nivel nacional (SENASA, 2010).

La LTI es transmitida principalmente por vía respiratoria. Esto ocurre mediante el contagio con aves con enfermedad respiratoria aguda, aves portadoras con infección latente, fomites y personal de campo contaminado. Los focos de infección dentro de una zona endémica se encuentran principalmente en sistemas de crianza aviar intensivo con múltiples edades (Hidalgo, 2003) como son las aves de postura comercial. Asimismo, la variación de la virulencia del virus de LTI (vLTI) en pollos, embriones de pollo y cultivos celulares hace necesaria la diferenciación entre las cepas vacunales y cepas de campo, lo cual es un problema de gran importancia en la práctica veterinaria (Kirkpatrick *et al.*, 2006), esto para los países que usan vacunas vivas contra LTI.

El diagnóstico presuntivo de LTI se basa en los signos clínicos típicos y la alta tasa de mortalidad, lo cual debe ser confirmado por una o más pruebas de laboratorio (Crespo *et al.*, 2007). Por otro lado, las estrategias de control mediante el uso de vacunas originadas en embrión de pollo y de cultivos celulares presentan una eficacia limitada. La ruta de vacunación intraocular es la recomendada, sin embargo resulta poco práctica en lotes de aves de engorde, mientras que la administración de vacunas vía agua de bebida ha dado resultados variables, habiéndose observado reacciones post-vacunales y disminución de los parámetros productivos (Villegas, 1998). Si bien en el Perú el gobierno no ha autorizado el uso de vacunas vivas para la prevención de LTI (SENASA, 2010), el incremento de incidencia de la enfermedad en el Perú hace necesario evaluar las vacunas comerciales disponibles en el mercado para encontrar programas de inmunización eficaces (Negrete, 2009).

La primera vacuna inactivada contra LTI fue desarrollada en Hungría reportándose una respuesta serológica satisfactoria y buena protección ante el desafío, evitando además la reacción post-vacunal y reversión a virulencia (debido a ser inactivada), otorgando una mayor seguridad que mediante el uso de vacunas vivas (Barhoom, 1986). Posteriormente a este reporte en el mundo no fueron utilizadas vacunas inactivadas contra LTI, sin embargo en los últimos años en el Perú fue desarrollada una vacuna inactivada que venía siendo usada en planteles de aves ponedoras. Por lo tanto, el objetivo del presente estudio fue evaluar la protección inducida mediante el uso únicamente de una vacuna inactivada contra LTI aplicada por vía subcutánea en tres diferentes programas en pollos de engorde. Los resultados obtenidos del estudio permitieron evaluar la protección inducida por la vacuna inactivada sola en pollos de engorde, para ser considerada como alternativa de vacunación.

II. REVISIÓN DE LA LITERATURA

2.1 Etiología

2.1.1 Clasificación del agente etiológico

El agente causal de la LTI es un virus perteneciente a la familia Herpesviridae, subfamilia Alphaherpesviridae, el cual ha sido clasificado taxonómicamente como *Gallid herpesvirus 1* (Kaleta, 1990; Hidalgo, 2003) (Ver diferentes herpesvirus asociados a enfermedades aviares en la Tabla 1). Este virus presenta un solo tipo viral antigénico y afecta únicamente el tracto respiratorio superior de las aves; no obstante, existe variabilidad en la virulencia entre cepas. De hecho, las cepas naturales de LTI presentan alta virulencia, dando lugar a elevadas tasas de mortalidad, mientras que existen cepas de baja virulencia que producen ligera o poca enfermedad aparente (Gerlach, 1994; SENASA, 2009).

2.1.2 Morfología del agente etiológico

El vLTI es un virus ADN con envoltura, cuyo genoma posee una molécula lineal de doble hebra de 155 Kb, está compuesto de un segmento largo (U_L) y un segmento corto (U_S) flanqueados por repeticiones invertidas (Baugust & Johnson, 1995). El ADN presenta una densidad de flotación de 1,704 g/ml similar entre los herpesvirus y presenta una proporción de guanina más citosina de 45% (Hidalgo, 2003). Imágenes obtenidas mediante micrografía electrónica demuestran la presencia de

partículas virales icosaédricas similares al virus de herpes simple (ver Figura 1). La partícula viral completa, incluyendo una envoltura irregular que rodea la nucleocápside, presenta un diámetro de 195 a 250 nm (Hidalgo, 2003; Fuchs *et al.*, 2007).

Tabla 1. Taxonomía y enfermedades ocasionadas por Herpesvirus aviares

SUBFAMILIA, GÉNERO	DESIGNACIÓN DE ESPECIE	ENFERMEDAD
α-Herpesviridae Haemorrhage V	Anatid HV 1	Plaga del pato (enteritis viral del pato, DVE)
	Gallid HV 1	Laringotraqueítis infecciosa (LTI)
β-Herpesviridae Hepatosplenitis V	Psittacid HV 1	Enfermedad de Pacheco en loros
	Psittacid HV 2	Enfermedad de Pacheco en loros
	Psittacid HV 3	Enfermedad de Pacheco en loros
	Columbid HV 1	Hepatitis con cuerpos de inclusión (esofagitis)
	Columbid HV 2	Hepatitis con cuerpos de inclusión (esofagitis)
	Strigid HV 1	Hepatosplenitis infecciosa strigum (HSiS)
	Falconid HV 1	Hepatitis y esplenitis con cuerpos de inclusión
	Acciprid HV 1	Hepatitis y esplenitis con cuerpos de inclusión
	Phalacrocoracid HV 1	¿?
	Gruvid HV 1	Hepatitis con cuerpos de inclusión
	Perdicid HV 1	Hepatitis y esplenitis con cuerpos de inclusión
	Ciconiid HV 1	Hepatitis y esplenitis con cuerpos de inclusión
γ-Herpesviridae Thetalympbokrypto V	Gallid HV 2	Enfermedad de Marek (MD)
	Meleagrid HV 1	Ninguna
No clasificados	Estrildid HV 1	¿?
	Ploceid HV 1	¿?
	Serimid HV 1	¿?

Fuente: Kaleta (1990)

Brevemente, el virión consta de cuatro unidades estructurales:

- La nucleocápside, la cual incluye una molécula de ADN, rodeada por un carrete de proteína fibrilar y presenta un diámetro de 80 a 100 nm de diámetro.
- La cápside compuesta por 162 capsómeros cóncavos elongados, 12 capsómeros pentaméricos y 150 capsómeros hexaméricos.

- c. El tegumento, que es una capa amorfa de proteína que envuelve a la cápside.
- d. La envoltura lipídica que contiene proyecciones finas que corresponden a espículas de glicoproteínas sobre la superficie (Matthews, 1984; Carter *et al.*, 2006; Ver Figura 1).

Las glicoproteínas, como en otros herpesvirus, son responsables de la estimulación de la inmunidad humoral y celular. Estudios de secuenciamiento del vLTI han identificado genes que codifican las glicoproteínas B, C, D, K, ICP4, ICP27, el complejo ADN helicasa y un gen homólogo a la glicoproteína X del virus de Pseudorabia (Bagust & Johnson, 1995). También se codificó la glicoproteína G cuya estructura es conservada en la mayoría de miembros de la subfamilia Alphaherpesviridae (Devlin *et al.*, 2006). Y se caracterizó la glicoproteína GP60, localizada en la región U_S característico en los Alphaherpesviridae, es una de las proteínas primarias encontradas en sueros de pollos infectados pero no se ha determinado su participación en la inmunidad o patogénesis de la enfermedad (Bagust & Johnson, 1995).

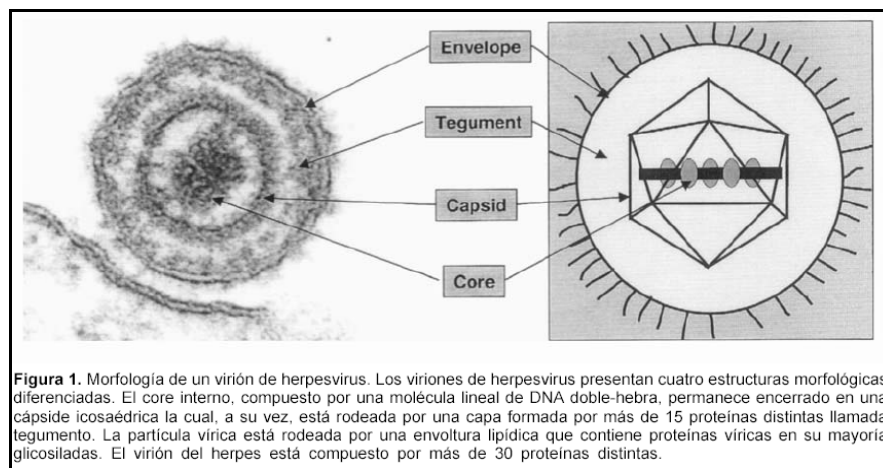


Figura 1. Morfología de un virión de Herpesvirus (Piñol *et al.*; 2004).

2.1.3 Replicación viral

La replicación del vLTI inicia con la infección de las células mediante adherencia a los receptores celulares luego de la fusión de la envoltura con la membrana plasmática, la nucleocápside es liberada en el citoplasma y será transportada hacia la membrana celular. Posteriormente el complejo viral ADN-proteína se libera y el material genético ingresará al núcleo a través de los poros

nucleares. La transcripción y replicación del ADN se llevará a cabo dentro del núcleo, mientras que el ARN generado en la transcripción se traducirá en el citoplasma (Matthews, 1984; Hidalgo, 2003). La replicación viral activa ocurre sólo durante la primera semana de infección, aunque niveles bajos de replicación pueden ser detectados hasta los 10 días post-infección (Bagust & Johnson, 1995).

El proceso de replicación se produce mediante un mecanismo circular con formación de concatémeros, que se escinden en unidades monoméricas y se empaquetan en las nucleocápsides preformadas dentro del núcleo. Alrededor de 70 proteínas son codificadas por el virus, entre enzimas y proteínas de unión al ADN que regulan la replicación, la mayoría son proteínas estructurales (Hidalgo, 2003), esta codificación se da a partir de los marcos de lectura abierta (ORF), similares a los genes del Alphaherpesvirus prototipo HSV-1 (Fuchs *et al.*, 2007). Las nucleocápsides con ADN adquieren una envoltura durante la migración a través de las láminas internas de la membrana nuclear y luego son re-envueltas con el tegumento en una segunda gemación de la región trans-Golgi, luego migran por el retículo endoplasmático y se acumulan en el citoplasma. Los viriones envueltos son liberados por lisis celular o fusión de membrana vacuolar y exocitosis (Hidalgo, 2003; Fuchs *et al.*, 2007).

2.1.4 Latencia viral

Al igual que varios miembros de la familia Herpesviridae, el vLTI establece infecciones latentes, lo cual ha sido demostrado mediante el aislamiento del virus desde la 7^o semana post-infección a partir de hisopados traqueales hasta los 2 meses post-infección mediante cultivo de órganos traqueales, y le permite evadir la respuesta inmune del hospedador y persistir en la población (Baugust & Johnson, 1995; Hidalgo, 2003; SENASA, 2009).

La integración del material genómico viral dentro del ADN de la célula hospedadora ocurre durante la fase de latencia viral. La presentación de la fase de latencia del vLTI puede ocurrir durante

la fase post-aguda inmediata (7 a 10 días después de la exposición traqueal) y puede durar toda la vida productiva del ave; o puede interrumpirse durante un episodio de estrés, inmunosupresión o enfermedad concomitante, al cual se conoce como “recrudescimiento”, involucrando la re-infección del epitelio respiratorio. Este proceso de recrudescimiento es vital, ya que los virus de campo o vacunales realizan pases regresivos a aves susceptibles, incrementando su virulencia hasta producir enfermedad clínica (Zavala, 2008). Este proceso de reactivación ocurrirá durante toda la vida del ave, con diseminación hacia otras aves susceptibles (Bagust & Johnson, 1995).

El ganglio trigémino es el sitio principal de latencia del vLTI, debido a que este ganglio proporciona la principal inervación sensorial a los tejidos del tracto respiratorio, es deducida la migración del virus mediante ruta neuronal. Se ha demostrado la reactivación del vLTI desde el ganglio trigémino en aves 15 meses después de la vacunación de un lote (Hidalgo, 2003). Asimismo, Williams *et al.* (1992) demostró mediante análisis de PCR la persistencia del vLTI en el ganglio trigémino de aves previamente inoculadas por ruta intratraqueal.

2.1.5 Persistencia del virus en el medio ambiente

Los Herpesvirus son virus frágiles en condiciones ambientales y por lo tanto tienen poca capacidad de sobrevivir fuera de los animales infectados. Los virus se inactivan rápidamente al ser expuestos a 55°C por 15 minutos ó 38°C por 48 a 72 horas. El precalentamiento de los galpones de crianza por 3 días a 37,8°C ha tenido éxito en la disminución de carga viral e inactivación del virus (Hidalgo, 2003; SENASA, 2009).

Además la infectividad del vLTI puede mantenerse por varios meses almacenado a 4°C en diluyentes como glicerol o caldo nutritivo. La infectividad del vLTI puede persistir en exudados traqueales y en las carcacas de aves por períodos de 21 y 80 días con temperaturas ambientales de hasta 20°C (Bagust & Johnson, 1995; Hidalgo, 2003). El vLTI es sensible a gran variedad de

soluciones desinfectantes, puede ser inactivado en menos de 1 minuto con soluciones de cresol al 3% o por la acción de una solución de soda cáustica (NaOH) al 1%. Las superficies pueden ser fácilmente descontaminadas con desinfectantes iodóforos o con mezclas de detergentes halogenados. La inactivación completa del vLTI se puede lograr mediante peróxido de hidrógeno al 5%. La infectividad del virus también es afectada por solventes orgánicos (agentes lipolíticos) como cloroformo y éter (Hidalgo, 2003; SENASA, 2009).

2.2. Epidemiología de la Laringotraqueitis infecciosa aviar

La LTI es una enfermedad de gran importancia en la industria avícola a nivel mundial y está incluida en la Lista E de la Oficina Internacional de Epizootias (OIE) (Hidalgo, 2003). La forma epizootica de la enfermedad se propaga rápidamente y las formas severas de la enfermedad causan alta morbilidad (90 a 100%) y la mortalidad varía entre 5% a 70%, siendo en promedio de 20%. La forma enzoótica leve ocasiona una morbilidad menor al 5% y muy baja mortalidad (0,1%-2%) (Hidalgo, 2003; Fuchs *et al.*, 2007).

2.2.1 Distribución geográfica

El vLTI está distribuido mundialmente con prevalencia regional o incidencia estacional (otoño e invierno) y parece ser serológicamente uniforme (Gerlach, 1994; Shane, 2005; Carter *et al.*, 2006). La LTI fue descrita por primera vez en un brote de enfermedad aguda en Rhode Island, Estados Unidos en 1925. Posteriormente la enfermedad ha tomado gran importancia en otros países de América, Europa, China, Sudeste Asiático, Australia y Nueva Zelanda, caracterizados por ser áreas de producción avícola con alta densidad de aves (Yauris, 2005). En América, actualmente el vLTI está presente en países como Canadá, Estados Unidos, México, Colombia, Argentina, Brasil, Chile, Bolivia y Perú. Los sectores más afectados son las aves reproductoras y de postura, aunque en México, Perú y Argentina el sector más afectado es el de pollos de engorde (Lozano, 2010).

2.2.2 Hospedadores

El vLTI se caracteriza por tener una alta especificidad de hospedadores ya que sólo los pollos y las gallinas son susceptibles, afecta principalmente a aves adultas o en crecimiento, mayores de 8 semanas de edad, aunque se han reportado infecciones a partir de los 10 días de edad (Gerlach, 1994; Zavala, 2008); sin embargo se detectó el vLTI en otras especies de gallináceas como faisanes, papagayos, gallinas de Guinea y pavos reales, por lo que se cree que fueron infectadas naturalmente mediante el contacto con pollos infectados (Kaleta, 1990, Hidalgo, 2003). Por otra parte, no existe evidencia de que el vLTI sea transmitido al ser humano u otros mamíferos (SENASA, 2009). Loudovaris *et al.* (1991) reportaron la presencia de resistencia genética al vLTI en diferentes líneas consanguíneas de pollos White Leghorn frente a diferentes niveles de virulencia de un aislamiento de campo, esto se debería a la presencia de diferentes haplotipos del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC).

2.2.3 Transmisión

El vLTI se transmite principalmente por vía aerógena. La transmisión ocurre frecuentemente a partir de aves con infección aguda, ya que el virus se elimina principalmente por las secreciones del tercio superior de la tráquea, mientras que la transmisión mediante el contacto con aves portadoras es más difícil de ocurrir. Por otro lado, el virus eliminado después de un período de latencia es otra fuente capaz de ocasionar enfermedad en aves susceptibles (Hidalgo, 2003).

El virus presenta una alta afinidad por el epitelio respiratorio (Gerlach, 1994), estando presente en el tejido traqueal y en secreciones por un período de 6 a 8 días (SENASA, 2010). La ingestión del virus puede ser otra forma de transmisión, pero después de eso debe producirse la exposición al epitelio nasal. No existe evidencia de una transmisión del vLTI a través del huevo o diseminación sobre cáscaras de huevos puestos por gallinas infectadas (Bagust & Johnson, 1995), el personal y fomites que entran en contacto con aves afectadas con LTI pueden contribuir en la

transmisión de la enfermedad a otras granjas (Zavala, 2008), otros animales como perros, ratas y otras aves pueden actuar como vectores mecánicos. La transmisión entre lotes ha sido relacionada principalmente a la proximidad geográfica y a fallas en la bioseguridad (movimiento de personal, eliminación inapropiada de aves muertas y heces e intercambio entre equipos de granja) (SENASA 2009).

2.2.4 Factores de riesgo

Se ha establecido que la única fuente de infección con el vLTI en la industria aviar son los pollos. A pesar del uso de vacunas, la producción de vLTI ocurrirá debido a la reactivación de la enfermedad a partir de infecciones latentes en algunas aves. El estrés ocasionado en las fases productivas así como la presencia de diferentes lotes de aves ocasionaría una mayor diseminación del virus (Bagust & Johnson 1995; Dufour-Zavala, 2008).

La edad es otro factor a tomar en consideración, debido a que la mayoría de aves que se enferman son gallinas o pollos de 3 semanas de edad. Por otro lado, no todos los brotes de LTI presentan la misma intensidad. Por lo tanto, la edad, la virulencia de la cepa, así como otros factores relacionados con el medio ambiente u otras infecciones simultáneas pueden influir en la presentación clínica de la enfermedad (SENASA, 2009).

2.2.5 Laringotraqueítis infecciosa aviar en el Perú

En nuestro país, la situación de la presencia del virus LTI no se encontraba muy bien definida hasta estos últimos años. A partir del año 1996, la OIE notificó al Perú como país libre de LTI sin vacunación. Asimismo, no se realizaba vacunación contra LTI desde hace más de 30 años (SENASA, 2010). Si bien informes serológicos no demostraban evidencia serológica de la presencia de LTI en el Perú (Yauris *et al.*, 2008), no fue sino hasta el 11 de Agosto del 2008, cuando el Laboratorio de Patología Aviar de la Facultad de Medicina Veterinaria – UNMSM reportó al Servicio

Nacional de Sanidad Animal (SENASA) la presencia de sintomatología clínica similar a LTI en una parvada de gallos de pelea, los cuales finalmente fueron diagnosticados con LTI mediante histopatología, PCR y aislamiento viral (Negrete, 2009).

Posterior a este reporte se comenzaron a tomar las medidas de prevención y control ante un brote de LTI, como el monitoreo oficial en la zona de Chíncha por estar en alto riesgo, así como en las ciudades de Lima, Ica, la Libertad, Arequipa, Tacna y el norte chico del país (Huacho y Barranca), zonas que comprenden una mayor población de pollos de carne y gallinas de postura comercial (SENASA, 2009). Diferentes estrategias han sido implementadas como las buenas prácticas de bioseguridad, limpieza, desinfección, control de plagas y vacíos sanitarios, tanto en zonas de crianza intensiva como en crianzas de riña y traspatio (Negrete, 2009). Asimismo, la disposición de laboratorios de diagnóstico de alta tecnología conjuntamente con el monitoreo epidemiológico en nuestro país constituyen un gran paso para el control de LTI (Salas, 2008; Negrete, 2009).

2.3. Patogénesis de la infección con Laringotraqueitis infecciosa aviar

La tabla 2 indica las fases de viremia y replicación en tejidos diana de virus de la Familia Herpesviridae. La patogénesis ocasionada por el vLTI comienza con la infección en el epitelio del tracto respiratorio superior y replicación viral. Desde los 3 a 5 días post-infección existe una concentración importante del virus y los primeros signos clínicos comienzan a los 5 a 7 días post-infección sugiriendo una diseminación viral muy activa que coincide con la fase de replicación viral. Los primeros tejidos en infectarse son la conjuntiva, mucosa nasal, hendidura palatina, siendo la tráquea y la laringe los tejidos diana (Zavala, 2008); no existe evidencia clara de una fase virémica de la infección, porque todo se focaliza en el aparato respiratorio superior (Hidalgo, 2003; SENASA, 2010; Lozano, 2010). El virus inducirá degeneración y necrosis, lesionando y exponiendo los vasos sanguíneos ocasionando hemorragias en el epitelio afectado. Por lo tanto, se desarrollará una reacción

inflamatoria local que puede ser catarral, fibrinosa, hemorrágica o fibrino-hemorrágica (Gilbert, 2010).

Se ha determinado que entre los 7 a 10 días post-infección el vLTI migra a través del nervio trigémino al ganglio del mismo nombre, debido a que este ganglio es el encargado de la innervación principal de los tejidos del tracto respiratorio superior, pico y ojos. Es en el ganglio trigémino donde el vLTI realizará latencia por períodos prolongados hasta su reactivación bajo situaciones de estrés (Bagust & Johnson, 1995; Chacón y Piantino, 2009). La latencia puede durar toda la vida productiva del ave, con períodos de enfermedad denominados “recrudescimiento” que involucra la infección del tracto respiratorio superior (Bagust & Johnson, 1995), eliminando virus al medio ambiente e infectando a otras aves (Santander, 2010).

Tabla 2. Duración de la viremia y células blanco en Herpesviridae

ENFERMEDAD/ INFECCIÓN	VIREMIA	CÉLULAS BLANCO	SEROGRUPOS CONOCIDOS
Enfermedad de Marek	Larga	Células T, células foliculares de las plumas	2
Pavo HV	Larga	Células T	1
Laringotraqueítis infecciosa	Poca o ninguna	Epitelio respiratorio superior	¿2?
Plaga del pato	Larga y variable	Células reticuloendoteliales	1
Enfermedad de Pacheco	Corta	Hepatocitos, linfocitos	>3
Halcón HV	Corta	Hepatocitos, epitelio de la faringe	1
Paloma HV	Corta	Hepatocitos, epitelio de la faringe	2
Búho HV	Variable	Hepatocitos, células del retículo	1
Cormorán del Lago Victoria	¿?	¿?	1
Cigüeña HV	Larga	Hepatocitos, epitelio de la faringe	1
Grulla HV	Ninguna	Hepatocitos, linfocitos	1
Codorniz HV	¿?	Hepatocitos (¿?)	1

Fuente: Kaleta, 1990

2.4. Sintomatología clínica

La severidad de la infección y desarrollo de la enfermedad por LTI está influenciada por la cepa viral involucrada, el estado inmune del lote afectado y las condiciones medioambientales (Shane, 2005). La aparición de los signos clínicos en el ave refleja una fase activa de replicación a nivel del epitelio de la tráquea (generalmente 6 a 12 días post-exposición natural). Los primeros cambios que ocurren incluyen una disminución en el consumo de alimento y agua, posteriormente un incremento en la mortalidad, la cual se duplica hasta un máximo hacia el día 7 a 12 luego de la aparición de los signos clínicos. Posteriormente aparecen las lesiones características de la enfermedad y mortalidad en intervalos irregulares y prolongados (Zavala, 2008; SENASA, 2009).

Devlin *et al.* (2008) ha clasificado los signos clínicos observados en LTI de acuerdo a su severidad, por ejemplo, la disnea es clasificada en una escala de 0 a 4; donde 0 indica la ausencia de signos, 1 disnea leve, 2 indica disnea moderada, 3 indica disnea severa con respiración a pico abierto, 4 indica una disnea muy severa con jadeo ocasional y 5 indica disnea severa con jadeos constantes (ver figura 4). Otros hallazgos clínicos como por ejemplo la conjuntivitis y alteraciones de la conducta general son clasificadas generalmente con grados de 0 a 2, donde 0 indican la ausencia de signos y 1 a 2 indican la presencia de signos leves y severos respectivamente. Por lo general, estas clasificaciones son realizadas para dar un diagnóstico total de los signos clínicos (Devlin *et al.*, 2006).

Desde un punto de vista clínico, la enfermedad ocasionada por LTI puede presentarse en varias formas: hiperaguda, aguda, subaguda y crónica. No obstante, algunas aves en buenas condiciones pueden morir incluso antes de la aparición de los signos característicos de la enfermedad (OIE, 2008).

En la forma hiperaguda de la enfermedad el comienzo del cuadro clínico es repentino, con una propagación muy rápida, las cepas virulentas de LTI causan severa disnea, jadeos y sonidos de

tos, durante la inspiración pueden ocurrir fuertes sonidos de jadeo, cuello extendido y cabeza levantada. La expectoración de moco sanguinolento es muy común en esta forma de enfermedad, se aprecia gorgoteo, crepitación y expulsión de coágulos de sangre en los suelos y paredes de los galpones (Gerlach, 1994; OIE, 2008). En algunos casos, las descargas sanguinolentas fibrinosas en la luz de la tráquea de las aves débiles pueden ocasionarles asfixia, mientras que la descarga conjuntival y nasal como la hinchazón de los senos infraorbitarios son frecuentes (Gerlach, 1994; Shane, 2005).

La fase aguda de la enfermedad se caracteriza por la presencia de disnea, jadeos, secreción nasal y estertores húmedos seguido de tos, estornudos, depresión, conjuntivitis y expectoración de exudado sanguinolento (Hidalgo, 2003; SENASA, 2009). Se ha descrito además en pollos de carne la presencia de secreción espumosa en ojos y párpados con adherencias, costras y presencia de salpicaduras de sangre en las plumas de las aves (Dufour-Zavala y Zavala, 2007). En infecciones epizooticas leves se puede apreciar la pérdida de productividad, disminución en la producción de huevos, secreción ocular, conjuntivitis, inflamación de los senos paranasales infraorbitarios, secreción nasal persistente y conjuntivitis de tipo hemorrágica (Hidalgo, 2003).

En la forma subaguda, el comienzo de la enfermedad es lento y la sintomatología respiratoria se puede extender durante algunos días antes de que aparezca la mortalidad en la aves. Por otro lado, la forma crónica de la LTI se da entre las aves supervivientes a cualquiera de las formas de la enfermedad descritas anteriormente. Por lo general los signos incluyen espasmos de tos y jadeo, descargas nasales, orales y disminución de la producción de huevos (OIE, 2008).

2.5. Lesiones

2.5.1. Lesiones macroscópicas

Durante el examen de necropsia de aves infectadas con el vLTI se puede apreciar que las lesiones se encuentran restringidas al aparato respiratorio superior, siendo de mayor importancia la

traqueítis hemorrágica. Se puede observar moco teñido con sangre o coágulos sanguíneos que cubren la totalidad o parte de la longitud de la tráquea a manera de moldes, además de rinitis mucoide, necrosis del epitelio traqueal y presencia de membranas diftéricas. Únicamente el aparato respiratorio está involucrado mientras que las demás vísceras tienen una apariencia normal. La muerte de las aves es inevitablemente por la asfixia que sufren (Kaleta, 1990; Bagust & Johnson, 1995; Hidalgo, 2003).

Otros hallazgos encontrados durante la necropsia van a depender de la fase de la infección, que puede ser inflamación catarral, hemorrágica o fibrinosa de la mucosa de la laringe y, en algunos casos de los bronquios y sacos aéreos pulmonares. La presencia de edema y congestión del epitelio conjuntival pueden ser otros hallazgos frecuentes. Otras lesiones pueden incluir la presencia de tacos caseosos, necróticos o pseudomembranas fribronecróticas en la laringe y la boca (Gerlach, 1994, Hidalgo, 2003, OIE, 2008). Por lo general, la cavidad abdominal está libre de lesiones durante la fase aguda; sin embargo, complicaciones secundarias pueden inducir lesiones en los sacos aéreos abdominales (Dufour-Zaval y Zavala, 2007).

2.5.2. Lesiones microscópicas

Durante la fase temprana de la infección con el vLTI se presenta degeneración e inflamación del epitelio, seguido por descamación, pérdida de células caliciformes e infiltrado inflamatorio. Posteriormente las células infectadas incrementan de tamaño, se vuelven edematosas y hay pérdida de cilios, se formarán sincitios celulares con invasión de linfocitos, histiocitos y células plasmáticas a nivel de la mucosa y submucosa. Las células infectadas presentan cuerpos de inclusión intranuclear eosinofílicos típicos denominados cuerpos de Seifried (Gerlach, 1994). Estos cuerpos de inclusión pueden ser hallados a los 3 días post-infección, desapareciendo conforme la enfermedad progresa (Hidalgo, 2003).

La destrucción celular y descamación resultarán en una superficie mucosa cubierta por una capa de células basales o se mantendrán descubiertas de revestimiento epitelial. Los vasos sanguíneos de la lámina propia se proyectan hacia la luz traqueal, lo que conlleva a hemorragia, destrucción y descamación epitelial con exposición y rotura de vasos sanguíneos (Hidalgo, 2003), así como un cuadro de hiperemia traqueal (Shane, 2005). Las lesiones microscópicas son clasificadas de acuerdo a un sistema propuesto por Guy *et al.* (1990) con grados que van de 0 (ausencia de lesiones microscópicas) a 5 (presencia de lesiones muy severas).

2.6. Desarrollo de Inmunidad contra Laringotraqueitis infecciosa aviar

Durante la fase post-infección con el vLTI se produce una gran variedad de respuestas por parte del sistema inmune. Evidencia circunstancial indica la importancia de la respuesta inmune mediada por células a nivel de la tráquea (Fahey & York, 1990; Leong *et al.*, 1994). De hecho, se ha mencionado que el principal mediador de resistencia a la infección con el vLTI es la respuesta inmune local mediada por células. Este tipo de respuesta inmune puede además ser estimulado mediante las vacunaciones (Hidalgo, 2003; SENASA, 2009).

En relación a la respuesta inmune humoral, se ha demostrado que los anticuerpos maternos transmitidos a la progenie no protegen contra la infección; no obstante no interfieren con la vacunación (Fahey & York, 1990; Brandao & Chacón, 2009). Experimentalmente se ha demostrado que entre los 3 a 7 días post-infección aumenta la cantidad de células productoras de IgA e IgG en la tráquea (Calnek, 2000). Estos anticuerpos, especialmente la IgA son componentes importantes para conferir resistencia a la infección en la superficie mucosa de la tráquea (Hidalgo, 2003). Por otro lado, un experimento realizado con ratones inmunizados con viriones de LTI demostró trece tipos de anticuerpos monoclonales, dirigidos contra las glicoproteínas C y J. Estos anticuerpos son utilizados actualmente para la detección del antígeno *in situ* en tejidos de aves infectadas (Veits *et al.*, 2003).

2.7. Diagnóstico de Laringotraqueitis infecciosa aviar

El diagnóstico de LTI debe diferenciarse de otras enfermedades respiratorias con sintomatología clínica y lesiones similares. La enfermedad debe ser diagnosticada en base a la historia del lote, sintomatología clínica, las lesiones anatomopatológicas y las pruebas de detección del virus (Chacón, 2005; Humberd *et al.*, 2002). Un diagnóstico exacto de LTI requiere principalmente de las pruebas de laboratorio, debido a que dependiendo del tipo de cepa involucrada, el cuadro clínico varía en intensidad y duración. Únicamente la variante aguda de LTI, con alta mortalidad y expectoración de sangre podría diagnosticarse a partir de la historia del lote, signos y hallazgos de necropsia. A pesar de ello, se requieren las pruebas diagnósticas para confirmar la infección (Chacón y Piantino, 2009; SENASA, 2010).

En la actualidad existen varias pruebas de laboratorio para el diagnóstico de LTI, las más comunes incluyen el aislamiento viral, la histopatología, Inmunofluorescencia directa y Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR). Otras pruebas utilizadas para la identificación del agente y anticuerpos incluyen la Neutralización Viral, Inmunodifusión viral en Gel Agar y ELISA (Gerlach, 1994; Hidalgo, 2003; OIE, 2008). Las muestras representativas para el diagnóstico de LTI provienen de la tráquea y laringe de aves recién muertas, aunque otros tejidos pueden ser también la conjuntiva y los párpados. Adicionalmente es conveniente al menos 30 muestras de suero por lote para el diagnóstico diferencial (SENASA, 2009).

2.7.1. Aislamiento viral

El aislamiento viral es la prueba muy utilizada para el diagnóstico de LTI. Se obtiene a partir de pasajes en embriones libres de patógenos específicos (SPF) o en cultivos celulares (dependiendo de la aplicación de pruebas como inmunofluorescencia o neutralización viral con suero) (Shane, 2005). El aislamiento del virus se realiza a partir de muestras de tráquea, laringe o hisopados de hendidura palatina, tráquea, laringe, conjuntiva y faringe (Zavala, 2008; Chacón & Piantino, 2009).

El vLTI es aislado a partir de huevos embrionados de pollos de 10 a 12 días de edad inoculados vía membrana corioalantoidea o en cultivos celulares de célula de hígado y riñón de pollos (Schnitzlein *et al.*, 1994). En los huevos embrionados es posible observar la formación de placas en las membranas corioalantoideas a los 2 días post-infección, como resultado de la necrosis y la reacción tisular proliferativa, la muerte embrionaria ocurre 2 a 12 días después y el tiempo de supervivencia de los embriones disminuye con los pasajes adicionales (Hidalgo, 2003; Chacón y Piantino, 2009). En los cultivos celulares se puede apreciar citopatología viral a las 4 a 6 horas post-inoculación con inflamación de células, desplazamiento de cromatina y formación de células multinucleadas, los corpúsculos de inclusión intranucleares están presentes a las 12 horas post-infección, se pueden apreciar vesículas citoplasmáticas en las células infectadas, los cuales se tornarán basófilos al degenerarse las células (Schnitzlein *et al.*, 1994; Hidalgo, 2003). Los cultivos celulares de hígado son el linaje celular más sensible a vLTI (Hughes & Jones, 1988).

2.7.2. Examen de histopatología

La histopatología continúa siendo el método estándar para el diagnóstico de LTI. Las muestras remitidas para el diagnóstico histopatológico corresponden al tercio superior de la tráquea, párpados y laringe (Zavala, 2008). Durante la observación microscópica es posible apreciar las lesiones características de LTI que incluyen la formación de sincitios epiteliales en la tráquea con corpúsculos de inclusión intranuclear, presencia de necrosis y hemorragia (Hidalgo, 2003; Shane, 2005; OIE, 2008).

A pesar de que el examen histopatológico es un método sencillo, rápido y económico, la determinación de cuerpos de inclusión intranuclear en los tejidos ha resultado ser menos sensible que el aislamiento viral, por lo que siempre se requiere aislamiento viral para confirmar la enfermedad (Gerlach, 1994, Hidalgo, 2003). No obstante existe correlación alta entre la histopatología y otras

pruebas diagnósticas como por ejemplo la inmunofluorescencia o pruebas de biología molecular (Zavala, 2008).

2.7.3. *Inmunofluorescencia directa*

La prueba de inmunofluorescencia directa es utilizada para demostrar el antígeno del vLTI en la mucosa del tracto respiratorio (Shane, 2005; OIE, 2008). Para ello, se remiten muestras de tráquea y laringe que son sometidas a raspado para desprender células epiteliales. Es una prueba rápida y de gran precisión para el diagnóstico de brotes (Dufour-Zavala y Zavala, 2007). Esta prueba requiere de anticuerpos marcados con isotiocianato de fluoresceína, las cuales se fijarán a las células que presenten antígeno viral. Además se requieren muestras provenientes de aves con signos clínicos incipientes y por lo general no es adecuada para tejidos de aves con más de 5 a 7 días de infección. La Inmunofluorescencia directa presenta una correlación muy alta (90%) con la histopatología y PCR (Zavala, 2008).

2.7.4. *Inmunofluorescencia indirecta*

La prueba de Inmunofluorescencia indirecta es un método de diagnóstico rápido y sencillo aunque tiene la desventaja de presentar reacciones cruzadas con otras infecciones (Chacón y Piantino, 2009). A pesar de ser una prueba superior a la Inmunodifusión en Agar gel, la interpretación de los resultados podría ser subjetiva (OIE, 2008).

2.7.5. *Inmunodifusión en agar gel (AGID)*

La inmunodifusión en agar gel es una prueba simple, económica de realizar y útil para el diagnóstico de LTI en lotes de aves, aunque presenta menores valores de sensibilidad que otras pruebas diagnósticas (Hidalgo, 2003; OIE, 2008). Esta prueba se realiza a partir de exudado raspado traqueal, membranas corioalantoideas y material de cultivos celulares infectados, para lo cual se utiliza antisuero hiperinmune contra LTI (Chacón y Piantino, 2009).

2.7.6. *Virus neutralización*

Las pruebas de neutralización viral pueden ser realizadas con membranas corioalantoideas desprendidas de huevos de pollo embrionarios que han sido incubados durante 9 a 11 días, momento en el que los anticuerpos neutralizan la formación de pústulas debido a LTI. Alternativamente, las pruebas de neutralización viral pueden realizarse en cultivos celulares en los que los anticuerpos neutralizan específicamente al vLTI y previene el efecto citopático (OIE, 2008).

2.7.7. *Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)*

La prueba de PCR ha sido utilizada con gran éxito para el diagnóstico del vLTI a partir de muestras de tráquea y otros órganos como conjuntiva y ganglios trigéminos, demostrando valores altamente sensibles y específicos. Por ello, el PCR es más sensible para el diagnóstico de infecciones agudas y latentes. Debido a que la tráquea es el órgano de replicación principal, es el tejido de predilección para el envío de muestras a laboratorios diagnósticos (OIE, 2008; Chacón y Piantino, 2009).

La prueba de PCR comienza con la extracción y purificación del ADN, para lograr identificar secuencias génicas del vLTI. Debido a la variabilidad de genes presentes en la secuencia de LTI (genes de expresión temprana, genes reguladores, genes estructurales y de expresión de proteínas), existen en la actualidad varias opciones de pruebas de PCR en el mercado. Además se han demostrado altos valores de correlación del PCR con pruebas como Inmunofluorescencia o histopatología (Zavala, 2008).

Una variante del PCR, el PCR en tiempo real (Real Time PCR) es una prueba que permite además la cuantificación de las partículas víricas que es de gran importancia en estudios de patogénesis y protección (Chacón y Piantino, 2009). Por otro lado, la prueba de PCR anidada (Nested PCR) presenta una sensibilidad alta que permite la detección de vLTI en aves sin lesiones específicas

de la enfermedad y sin necesidad de amplificar el ADN de otros patógenos aviares (Humbert *et al.*, 2002). Por lo tanto es útil en casos donde la histopatología y la inmunofluorescencia son negativas (Crespo *et al.*, 2007).

2.7.8. Inmunoabsorbancia ligada a enzima (ELISA)

La prueba de ELISA es la prueba más utilizada para el diagnóstico serológico en grandes poblaciones de aves (Chacón, 2005; Guy y García, 2008). El ELISA es utilizado para confirmar infección con vLTI mediante un aumento significativo de anticuerpos en muestras de suero pareadas obtenidas durante las fases aguda y de recuperación (Shane, 2005). No obstante, Zavala (2008) indicó que la prueba de ELISA tiene poca utilidad ya que podría dar resultados positivos en algunas aves no infectadas o sin signos clínicos. Además el ELISA no tiene ningún valor predictivo en cuanto a protección, debido a que la inmunidad dirigida contra LTI no depende exclusivamente de los anticuerpos. No obstante, la prueba de ELISA puede resultar útil en lotes de aves donde no se practica la vacunación, donde la elevación de títulos de anticuerpos dependería de los resultados de serología (Chacón y Piantino, 2009).

A diferencia del ELISA para detección de anticuerpos, el ELISA para detección de antígenos se realiza a partir de raspados de la mucosa traqueal (OIE, 2008). No obstante, tiene la desventaja que solo permite la detección de antígenos virales durante las etapas tempranas de infección (Guy & García, 2008). A pesar de ello, se muestra más eficiente que la Inmunofluorescencia en la detección de antígeno viral (Abbas *et al.*, 1996; Alexander *et al.*, 1998).

2.8. Diagnóstico diferencial

Debido a que la infección con el vLTI ocasiona una enfermedad respiratoria, se deben tener en cuenta otras enfermedades que ocasionan un curso clínico similar, entre los que tenemos a:

- a) Newcastle e Influenza Aviar: debido a complicaciones similares en la mucosa traqueal, sin embargo su difusión es más rápida y existe diseminación a otros órganos.
- b) Bronquitis Infecciosa Aviar: también presenta lesiones en tracto respiratorio inferior y no se observan formaciones de pseudomembranas a nivel traqueal (Nakamura *et al.*, 1996).
- c) Difteroviruela por Poxvirus: ocasiona lesiones similares en laringe y faringe pero también hay lesiones en cavidad oral y esófago, además existe diseminación a otros órganos con corpúsculos de inclusión intracitoplasmáticos.

Otras enfermedades que se deben tener en consideración son la avitaminosis A, Cólera Aviar, Coriza Infecciosa, Hepatitis a corpúsculos de inclusión, Micoplasmosis Aviar, Tuberculosis Aviar y enfermedades ocasionadas por Reovirus y Adenovirus (Negrete, 2009; SENASA, 2009; SENASA, 2010).

2.9. Prevención y control de la enfermedad

En la actualidad no existen tratamientos específicos para la infección ocasionada por el vLTI. Por lo tanto, se justifican las estrictas medidas de bioseguridad en áreas endémicas (Shane, 2005). La importancia de la cuarentena, la higiene de los galpones, y la prevención del movimiento de personal, equipos, alimentos y aves potencialmente contaminados con el virus es esencial para el control de la prevención de la enfermedad. Asimismo, el control cooperativo entre el gobierno y la industria es lo más deseable. Cuando un brote ha sido contenido, los lotes de aves recuperadas deben ser llevados a procesamiento rápidamente (Hidalgo, 2003).

Según el código sanitario de animales terrestres, los países importadores de aves como pollos, gallinas y huevos deben exigir un certificado que certifique la procedencia de explotaciones libres de la enfermedad, tras resultar negativos a las pruebas serológicas y que no fueron vacunados, o en todo caso del tipo de vacuna utilizada, mientras que en el caso de huevos, se debe pedir un documento que

demuestre la desinfección según las normas establecidas (OIE, 2008). Por otro lado, el tiempo de descanso sanitario en granjas debe ser como mínimo de tres semanas (Dufour-Zavala y Zavala, 2008).

2.9.1. Vacunación

Los programas de vacunación constituyen un componente esencial en los programas de prevención y control de LTI en los sistemas de producción. Resulta de vital importancia que los esfuerzos en la vacunación sean bien controlados, debido a que una mala vacunación puede acelerar un brote en lugar de controlarlo (Dufour-Zavala y Zavala, 2008).

Los principios utilizados en la efectiva vacunación de las aves no son diferentes a aquellos utilizados durante los primeros años de desarrollo de las vacunas. Virus atenuados o cepas de campo de virulencia leve son utilizados para producir una infección subclínica o una forma leve de la enfermedad. Opcionalmente, el virus vacunal se disemina de ave a ave y estimula la producción de anticuerpos protectores de tipo IgG a nivel sanguíneo e IgA en la mucosa. Posteriormente, la reinfección de pollos inmunizados estimulará una respuesta de memoria conduciendo a la rápida producción de anticuerpos contra el virus invasor. Idealmente, un virus vacunal se replica únicamente en tejidos específicos y producen protección local (Dekich, 1998).

La LTI ha sido la primera enfermedad en ser controlada mediante el uso de vacunas vivas. Actualmente existen dos tipos de vacunas vivas utilizadas: las vacunas producidas en huevos embrionados (CEO) y las vacunas producidas en cultivo celular (TCO). Las vacunas CEO son más inmunogénicas y son comúnmente utilizadas en crianza de pollos de carne en áreas endémicas. Por otro lado, existen además vacunas recombinantes que utilizan vectores como el Virus de Viruela Aviar o Herpesvirus de Pavo (Hidalgo, 2003; Dufour-Zavala y Zavala, 2007; Chacón y Piantino, 2009).

Las vacunas inactivadas también han sido utilizadas para el control de la transmisión de LTI. Barhoom *et al.* (1986) vacunaron pollos de carne con vacuna inactivada y demostraron una respuesta serológica satisfactoria y protección contra desafío con cepas de campo y de laboratorio. Aunque solo se pudo alcanzar un aumento mínimo en el título de anticuerpos mediante dosis repetidas de vacunas activadas (2 a 5 semanas luego de la primera vacunación), la protección conferida por una sola dosis pareció ser efectiva por al menos 12 meses.

De forma general, la vacunación contra el vLTI sólo debe ser realizada en áreas donde la enfermedad es endémica, ya que la vacunación podría resultar en una presentación de aves portadoras a largo plazo (esto se debe a la capacidad del virus de hacer latencia en ganglios sensoriales como el trigémino y sufrir reactivación ante condiciones de estrés). Además, las vacunas actuales son de por sí patógenas, lo que conlleva a un costo económico resultante (disminución de parámetros productivos). Esto ha llevado a no vacunar con vacunas para el control de LTI a menos que la región se encuentre en un brote activo de la enfermedad (Gerlach, 1994; Hidalgo, 2003).

a) Vacunas vivas atenuadas

Todas las vacunas actuales desarrolladas para la prevención y control de brotes de LTI se basan en el uso de cepas vivas adecuadas o modificadas. Este tipo de vacunas poseen cierto grado de virulencia residual, natural o a través de atenuación y son producidas utilizando embriones de pollos o cultivos celulares (Bagust & Johnson, 1995; Hidalgo, 2003). Este tipo de vacunas mantienen su patogenicidad inherente, por lo que se requiere un cuidadoso control en relación a la dosis y condiciones de administración. En efecto, se ha demostrado la diseminación de virus vacunal de aves vacunadas a aves no vacunadas, lo que sumado al hecho de que los niveles de virulencia pueden incrementarse por los pasajes entre aves o lotes resultaría en una reversión a la virulencia (Bagust & Johnson, 1995).

El uso de vacunas CEO en aves adultas en galpones de alta densidad tiende a mantener el virus alrededor, con el riesgo de infectar a poblaciones susceptibles de aves más jóvenes como los pollos de carne (Dufour-Zavala y Zavala, 2007). Por otro lado, las vacunas TCO (generadas en pasajes en cultivos celulares) ofrecen menor protección que las vacunas CEO ya que son atenuadas por pasajes y son menos inmunogénicas. Este tipo de vacunas son comúnmente utilizadas en reproductoras y ponedoras (Hidalgo, 2003).

Diferentes estudios han sido llevados a cabo para evaluar la eficacia del uso de las vacunas vivas atenuadas para el control de LTI. Han & Kim (2003) evaluaron la eficacia de cuatro vacunas comerciales de virus vivo contra LTI mediante PCR y RFLP por ruta ocular en aves de seis semanas, demostrando la ausencia de signos clínicos post-desafío viral. Por otro lado, Rodríguez *et al.* (2007) evaluaron la replicación y transmisión de vacunas de LTI en tejidos seleccionados así como la transmisión a aves expuestas. Los resultados indicaron altos niveles de replicación en tráquea y conjuntiva, además de transmisión a aves de contacto, principalmente más mediante el uso de vacunas ECE que con vacunas TCO. Además se demostró la migración de ambas vacunas al ganglio trigémino.

b) Vacunas inactivadas

El uso de vacunas inactivadas para el control de LTI se ha realizado a partir de virus LTI entero inactivado (Barhoom *et al.*, 1986). Se basan microorganismos muertos o inactivados que, utilizando además sustancias o métodos que produzcan pocos cambios en el antígeno y que a la vez estimulen la inmunidad protectora (Tizard, 1998). Estas vacunas para el control de LTI han sido utilizadas hace más de 20 años y los estudios demuestran un efecto protector comparados con el uso de vacunas de cultivo celular (Fernández, 2009).

Las vacunas inactivadas, en especial aquellas formuladas en aceite mineral, inducen la producción de altos niveles de inmunoglobulina G que pueden persistir por más de 1 año. Además, estas vacunas inducen células T respuestas inflamatorias en los pollos, aunque no son tan eficientes en la producción de una respuesta inmune local como mediante el uso de vacunas vivas (Rautenschlein *et al.*, 2012); aunque se cree que las inmunoglobulinas Y podría alcanzar el epitelio respiratorio y conferir inmunidad local. Resultados obtenidos mediante el uso de vacunas inactivadas en otras enfermedades aviares como Influenza, han demostrado la eficacia del uso de este tipo de vacunas en limitar la secreción viral (Swayne *et al.*, 2006).

c) Vacunas recombinantes

En relación a las vacunas recombinantes, estudios científicos han sido desarrollados para la inserción de genes patógenos de LTI en virus vectores como Marek y Viruela, como por ejemplo los genes que codifican a las glicoproteínas B y D (Hidalgo, 2003). Las vacunas recombinantes utilizadas en la industria avícola han sido construidas seleccionando eventos de recombinación genética relativamente raros, homólogos *in vivo*. Esta técnica depende de introducir un fragmento de ADN dentro de células de cultivo tisular por transfección y luego co-transfección del cultivo con ADN viral o infectando el cultivo con el virus. Esta técnica puede ser utilizada para mutar un gen viral reemplazándolo con un gen foráneo o marcador. Sin embargo, por diferentes razones, estas cepas atenuadas vivas del VLTI no han sido adecuadas candidatas como vacunas comerciales (Hidalgo, 2003).

Se han realizado diferentes estudios para demostrar la eficacia de las vacunas recombinantes en el control de LTI. Sun *et al.* (2008) construyeron un virus de viruela aviar recombinante co-expresando los genes de fusión y hemaglutinina-neuraminidasa del virus de la enfermedad de Newcastle y el gen de la glicoproteína B del VLTI. Al evaluar la capacidad de este virus de proteger a aves SPF contra los signos clínicos y mortalidad ante el desafío de estas dos enfermedades, todas las

aves vacunadas sobrevivieron al desafío y fueron protegidas en un 70%. Por otro lado, Tong *et al.* (2001) evaluaron la protección de pollos con una vacuna recombinante de viruela aviar que expresa la glicoproteína B del VLTÍ frente al desafío con LTI que protegió completamente a los pollos SPF vacunados desafiados, mientras que el 90% de las aves no vacunadas desafiadas murieron. Ellos concluyeron que las vacunas recombinantes pueden ser vacunas potencialmente seguras para reemplazar las actuales vacunas vivas modificadas para prevenir la LTI.

d) Nuevas tecnologías

La inmunización genética es otro enfoque para inducir inmunidad protectora a las enfermedades infecciosas. Las vacunas de ADN pueden ser relativamente rápidas y fáciles de generar. El ADN plásmido no es infeccioso y no se replica. Además, el ADN plásmido es estable y puede ser almacenado bajo condiciones que podrían destruir un virus vivo. Asimismo, el ADN plásmido puede ser administrado por una variedad de métodos, incluyendo la potencial administración *in ovo*. El aumento de la eficacia de las vacunas de ADN y el desarrollo de una aplicación práctica de esta tecnología con beneficio económico son los requisitos para la aceptación por la industria aviar (Hidalgo, 2003).

Se está utilizando una cepa deficiente en el factor de virulencia IgG del VLTÍ que ha demostrado ser menos patógeno que las cepas vacunales disponibles actualmente después de la inoculación intratraqueal en pollos libres de patógenos específicos. La inoculación intratraqueal también ha demostrado inducir protección contra la enfermedad después del desafío con virus virulento. Sin embargo, la inoculación intratraqueal no es adecuada a gran escala para los lotes aviares comerciales. Se ha encontrado que la inoculación ocular y por el agua de bebida fue segura con el VLTÍ deficiente en gG, y los niveles de eficacia protectora fueron comparables con la inoculación intratraqueal. Por lo tanto, el VLTÍ deficiente en IgG parece tener un potencial para el uso en programas de vacunación a gran escala cuando se administra vía ocular o en agua de bebida (Devlin *et al.*, 2008).

2.9.2. Estrategias de control

El enfoque más efectivo para el control de un brote de LTI involucra el esfuerzo coordinado para obtener un diagnóstico rápido, la implementación de un programa de vacunación adecuado y evitar la propagación ulterior del virus. Por otro lado, la infectividad del vLTI fuera de su hospedador se ve limitada por el uso de desinfectantes y altas temperaturas. Además el período de descanso de las instalaciones favorecerá el control del vLTI en los galpones (Hidalgo, 2003; Dufour-Zavala y Zavala, 2007).

Es importante tener en cuenta que el control de LTI no depende exclusivamente del uso de vacunas, ya que se requieren otros enfoques como por ejemplo la bioseguridad, limpieza y desinfección, el control de potenciales depredadores, el uso de sistemas informáticos para la localización de granjas afectadas, el transporte de aves vivas infectadas por rutas sanitarias así como el manejo adecuado de la cama y material contaminado (Zavala, 2008). Es de vital importancia el aislamiento inmediato de los lotes infectados y la restricción de movimiento de aves sospechosas y materiales presumiblemente infectados. Únicamente la salida de estas aves estará confirmada cuando el destino final sea la faena. El levantamiento de cuarentena se realizará solo cuando el organismo responsable de la evaluación certifica que hay ausencia de signos clínicos de LTI y haya cumplimiento de actividades de vacunación preventiva e higiene y bioseguridad coordinada (Bagust & Johnson, 1995; SENASA, 2009).

2.10. Erradicación

La erradicación del vLTI parece ser complicada en los establecimientos de crianza avícola debido a las propiedades biológicas y ecológicas del virus. Como ha sido mencionado anteriormente, el virus es altamente específico por su hospedador no existiendo un reservorio silvestre, además el virus presenta relativa fragilidad y capacidad infectiva fuera del hospedador y tiene una estructura genómica relativamente estable. Debido a que las cepas de LTI son antigénicamente homogéneas, una

sola vacuna es capaz de brindar protección cruzada contra todas las cepas (Hidalgo, 2003). Sin embargo, la propiedad de latencia del virus podría disimular la eliminación total del virus en el campo, que reaparecería ante una situación de estrés de las aves.

Un programa de erradicación de LTI debe considerar la proporción costo-beneficio y la probable escala de tiempo para su introducción, una vez que la factibilidad del programa sea aceptada (Bagust & Johnson, 1995). Los programas de erradicación deben incluir reconocimiento y diagnóstico inmediato de la enfermedad, además de una comunicación eficaz de entre las autoridades y los productores. Es muy importante que las aves dentro de un mismo escenario geográfico sigan los mismos programas de control y erradicación en todo momento. Estos programas deben funcionar básicamente para mantener un bajo número de casos, aunque no siempre se controlan con rapidez los brotes (Dufour-Zavala y Zavala, 2007).

III. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Lugar de estudio

- a) La crianza de las aves y las evaluaciones de signos clínicos se realizaron en los módulos de experimentación del Laboratorio de Patología Aviar de la Facultad de Medicina Veterinaria – UNMSM
- b) Las necropsias y evaluaciones de lesiones se llevaron a cabo en Laboratorio de Patología Aviar de la Facultad de Medicina Veterinaria – UNMSM

3.2. Animales

Para el presente estudio se utilizaron un total de 180 pollos BB machos de un día de edad, de la línea Ross procedentes de gallinas reproductoras de granjas libres de LTI no vacunadas.

3.3. Alimentación de las aves

Las aves fueron alimentadas de acuerdo a un programa estándar de crianza de pollos de engorde. La alimentación de las aves se realizó *ad libitum* utilizando una fórmula comercial de alimento concentrado de acuerdo a los requerimientos nutricionales para cada fase de crianza durante el experimento (pre-inicio, inicio, acabado y terminado). El agua también fue suministrada *ad libitum*.

3.4. Diseño experimental

3.4.1. Tratamientos

Las aves fueron distribuidas al azar en 4 tratamientos los cuales estuvieron conformados por 3 repeticiones de 15 aves cada uno (45 aves por tratamiento). La descripción de los tratamientos es presentada a continuación:

Tabla 3. Descripción de tratamientos

TRATAMIENTO	DESCRIPCIÓN
T1	Aves vacunadas al 1° día de edad con una dosis de 0,3 mL de vacuna inactivada de LTI aplicada por vía subcutánea
T2	Aves vacunadas al 12° día de edad con una dosis de 0,3 mL de vacuna inactivada de LTI aplicada por vía subcutánea
T3	Aves vacunadas al 1° y 12° día de edad con dosis de 0,3 mL de vacuna inactivada de LTI aplicada por vía subcutánea
T4	Aves no vacunadas contra LTI (control)

El cálculo de tamaño de muestra fue determinado a partir de la fórmula de estimación de tamaño muestral para una diferencia de proporciones. Considerando una tasa de mortalidad por LTI de 60%, una reducción de mortalidad entre tratamientos de 25%, una probabilidad de cometer un error de tipo 1 de 5% y un poder de prueba de 59,2% obtuvimos un número de 45 aves por tratamiento.

3.4.2. Desafío viral

A los 30 días de edad las aves fueron desafiadas con 0,2 mL de un inóculo conteniendo un virus patógeno de LTI aislado de un brote de campo en aves de postura con un título de 10^5 DIE₅₀/mL. El desafío viral fue realizado mediante ruta intratraqueal (2 gotas) y ocular (1 gota). El cronograma de actividades es presentado con detalle en la tabla 4.

Tabla 4. Cronograma de actividades del estudio

DÍAS DE EVALUACIÓN	ACTIVIDADES			
	T1	T2	T3	T4/control
1	Vacuna contra LTI	-	Vacuna contra LTI	-
12	-	Vacuna contra LTI	Vacuna contra LTI	-
30	Desafío viral			
30-47	Evaluación clínica y anatomopatológica			

3.4.3. *Parámetros para la evaluación de signos clínicos post-desafío*

Se observaron los siguientes parámetros de evaluación ante-mortem desde la etapa post-desafío hasta final de campaña. Se realizó un examen clínico general e individual, considerando la presencia de ronquera, estornudos y conjuntivitis. La clasificación de los signos observados es una adaptación según lo descrito por Devlin *et al.* (2008):

Tabla 5. Clasificación de signos respiratorios

GRADOS	SIGNOS RESPIRATORIOS
0	Sin signos de ronquera
1	Con signos de ronquera

Tabla 6. Clasificación de la presencia de estornudos

GRADOS	PRESENCIA DE ESTORNUDOS
0	Sin estornudos
1	Con estornudos

Tabla 7. Clasificación de la presencia de conjuntivitis

GRADOS	PRESENCIA DE CONJUNTIVITIS
0	Sin signos de conjuntivitis
1	Con signos de conjuntivitis

3.4.4. *Parámetros para la evaluación de lesiones macroscópicas post-desafío*

Se realizó el sacrificio de 4 aves por tratamiento en los días 7, 11 y 17 post-desafío viral, evaluando las lesiones macroscópicas en coanas, laringe, tráquea y sacos aéreos, en búsqueda de lesiones sugerentes al desafío viral.

Tabla 8. Clasificación de las lesiones en coanas

GRADO	LESIONES EN COANAS
0	Presencia de exudado mucoso
1	Presencia de material caseoso
2	Presencia de algunas placas diftéricas
3	Presencia de varias placas diftéricas

Tabla 8. Clasificación de las lesiones en laringe

GRADO	LESIONES EN LARINGE
0	Ausencia de placas diftéricas
1	Leve presencia de placas diftéricas
2	Moderada presencia de placas diftéricas
3	Presencia de gran cantidad de placas diftéricas

Tabla 10. Clasificación de las lesiones en tráquea

GRADO	PRESENCIA DE MUCOSA TRAQUEAL	PRESENCIA DE PETEQUIAS Y/O HEMORRAGIAS TRAQUEALES
0	Sin lesiones	Sin lesiones
1	Leve exudado en mucosa	Leve presencia de petequias
2	Moderado exudado mucoso	Moderada presencia de petequias
3	Severo exudado mucoso	Severa presencia de petequias
4	Muy severo exudado mucoso y hemorrágico	Muy severo cuadro hemorrágico en la tráquea

Tabla 11. Clasificación de las lesiones en sacos aéreos

GRADO	LESIONES EN SACOS AÉREOS
0	Sacos aéreos normales
1	Aerosaculitis con material espumoso
2	Aerosaculitis con material mucopurulento
3	Aerosaculitis con material caseoso

Adicionalmente se levantó información relacionada a los parámetros productivos de peso corporal y ganancia de peso.

3.5. Análisis de datos

Los resultados de las evaluaciones de signos clínicos y lesiones fueron organizados como base de datos en una hoja de cálculo de Excel. Posteriormente la base de datos ingresó al programa estadístico STATA 12.0 para los análisis correspondientes. Se presentaron tablas para la evaluación de los signos clínicos y lesiones macroscópicas por tratamientos indicando valores estadísticos descriptivos, los análisis de los resultados presentaron un nivel de confianza del 95%.

En relación a los signos clínicos, se presentan las frecuencias para cada tratamiento, las diferencias estadísticas fueron analizadas mediante pruebas de Chi cuadrado y Exacta de Fisher ($H_0: p_1=p_2=p_3=p_4$). Mientras que la evaluación de escalas de las lesiones macroscópicas es presentada mediante valores estadísticos promedio, medianas, valores mínimos y máximos; y la comparación de los scores fue analizada mediante la prueba no paramétrica de Kruskal Wallis ($H_0: T_1=T_2=T_3=T_4$).

IV. RESULTADOS

4.1. Parámetros productivos

4.1.1. *Peso corporal*

Durante la primera, segunda, tercera, cuarta y quinta semana los pesos mantuvieron la misma tendencia, los promedios más altos se encontraron en las aves T4/control mientras que los valores más bajos se observaron en las aves T2. Sin embargo, en la sexta semana de evaluación se pudo apreciar que los valores de peso corporal más altos se encontraron en las aves de T1 (2406 gr), seguido por las aves T4/control (2396.33 gr), mientras que los valores más bajos se observaron en las aves T3 (2192.33 gr). El análisis de varianza a final de campaña indicó diferencias significativas entre los tratamientos T1 y T2, T1 y T3, T2 y T4, y, T3 y T4 ($p<0.05$) (Figura 2).

4.1.2. *Ganancia de peso*

En relación a la ganancia de peso los resultados indicaron mayores ganancias durante la primera semana en las aves T4/control (15.30 gr) y T3 (14.93 gr). A la segunda semana las ganancias más altas se encontraron en las aves T4/control (33.33 gr), T3 (31.67 gr) y T1 (31.67 gr). Esta tendencia se mantuvo durante la tercera y cuarta semana de evaluación. A partir de la quinta semana los valores de ganancia más altos se observaron en las aves de T1 (104 gr) y T4/control (102.67 gr). La evaluación a final de campaña indicó que los valores más altos de ganancia se encontraron en las

aves T1 (58.67 gr) y T2 (55.67 gr). No se encontraron diferencias significativas entre tratamientos a final de campaña ($p>0.05$) (Figura 3).

Figura 2. Representación de los pesos promedio semanales para cada tratamiento (formato de Gráfica Stata 12.0)

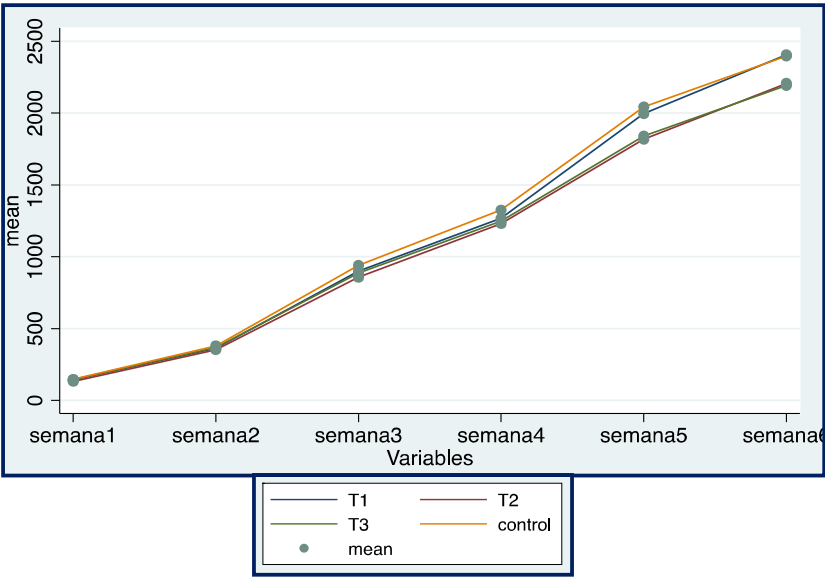
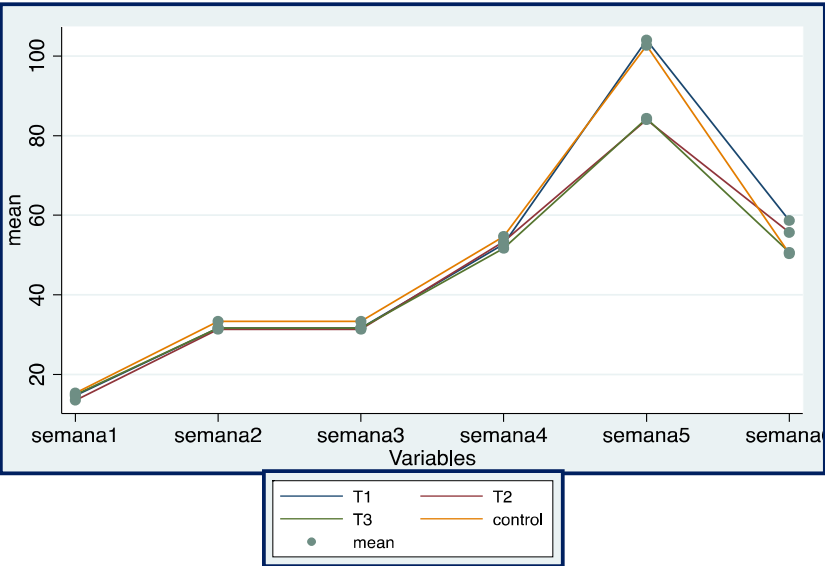


Figura 3. Representación de las ganancias de pesos semanales para cada tratamiento (formato de gráfica Stata 12.0)

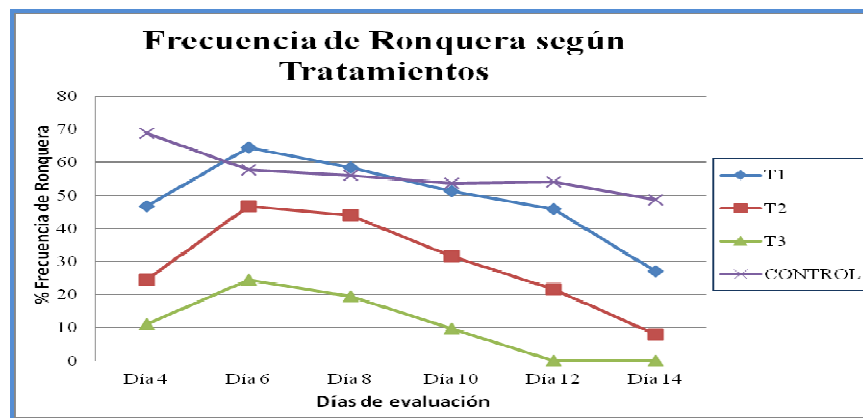


4.2. Evaluación de signos clínicos

4.2.1. Ronqueras

La evaluación de ronqueras post-desafío viral es resumida en la Figura 4. Durante el día 4 post-desafío las aves de todos los grupos presentaron ronquera, siendo el grupo T4 (control) el que presentó la mayor frecuencia de ronqueras (68.89%) mientras que las aves de T3 presentaron la menor frecuencia (11.11%), todas las frecuencias fueron estadísticamente diferentes ($p<0.05$). Al día 6 y 8 post-desafío las frecuencias más altas de ronqueras se presentaron en las aves T1 y las menores frecuencias se encontraron en las aves T3 ($p<0.05$). Al día 10, 12 y 14 post-desafío se mantuvieron las tendencias de frecuencias de ronquera, las más altas presentaciones fueron en las aves T4/control y las frecuencias más bajas de ronqueras se observaron en las aves de T3 e incluso dejaron de presentar ronqueras. El análisis de Chi cuadrado resultó estadísticamente significativo ($p<0.05$).

Figura 4. Representación de la frecuencia de ronquera según tratamientos

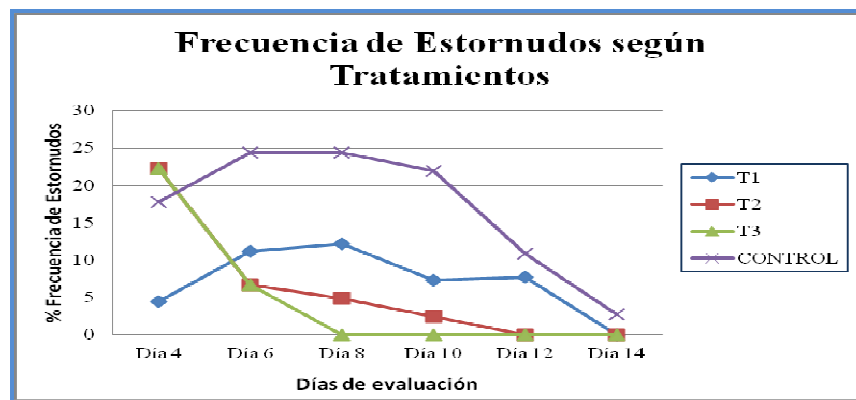


4.2.2. Estornudos

La evaluación de estornudos durante la fase post-desafío es resumida en la Figura 5. Al día 4 post-desafío las aves T2 y T3 presentaron las frecuencias más altas de estornudos (22.22%), mientras que las aves T1 las más bajas (4.44%); en tanto el análisis de frecuencias no resultó estadísticamente significativo ($p>0.05$). A los 6 días post-desafío, las aves T4/control presentaron la mayor frecuencia de estornudos (24.44%), mientras que T2 y T3 presentaron la menor frecuencia de aves con

estornudos (6.67%); el análisis de las frecuencias resultó estadísticamente significativo ($p<0.05$). Al día 8 y 10 post-desafío, las frecuencias más alta de estornudos se mantuvieron en las aves T4/control y en las aves T3 no se observaron estornudos, siendo el análisis de frecuencias estadísticamente significativo ($p<0.05$). A partir del día 12 post-desafío, la frecuencia de estornudos comenzó a disminuir de forma general, siendo de 10.81% en las aves T4/control, mientras que T2 y T3 no presentaron aves con signos de estornudos ($p<0.05$). Al día 14 post-desafío, únicamente las aves T4/control presentaron estornudos.

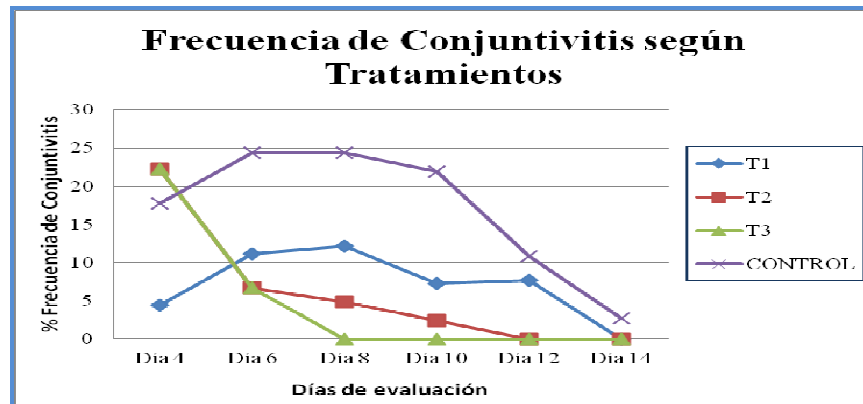
Figura 5. Representación de la frecuencia de estornudos según tratamientos



4.2.3. Conjuntivitis

La evaluación de conjuntivitis post-desafío en las aves es representada en la Figura 6. Al día 4 se observaron algunas aves con conjuntivitis en los tratamientos T1, T2 y T3 (2.22%) mientras que las aves T4/control no presentaron este signo. Sin embargo, a partir del día 6 hasta el día 10 únicamente las aves T4/control presentaron signos de conjuntivitis, mientras que no se observaron dichos signos en los demás tratamientos. A partir del día 12 post-desafío no se observaron aves con conjuntivitis.

Figura 6. Representación de la frecuencia de conjuntivitis según tratamientos



4.3. Evaluación de las lesiones macroscópicas

4.3.1. Laringitis

En relación a las lesiones macroscópicas, la evaluación de lesiones asociadas a laringitis al día 7 post-desafío, no se observaron lesiones en ninguno de los tratamientos. Al día 11 post-desafío, el score promedio más alto de lesiones se encontraron en las aves T4/control (1.5, moderada presencia de placas diftéricas), mientras que los valores más bajos de lesiones se observaron en las aves de T3 (promedio de score=0.25); no se observaron diferencias significativas entre los scores de lesiones a nivel de tratamientos ($p>0.05$; *Kruskal Wallis test*). Al día 17 post-desafío las aves de T2 presentaron los scores más altos de lesiones (promedio=0.75; mediana=0.5; leve presencia de placas diftéricas), mientras que T1 y el T4/control presentaron menores score de lesiones y las aves de T3 no presentaron lesión alguna, no obstante score no resultaron estadísticamente diferentes ($p>0.05$ *Kruskal Wallis*).

4.3.2. Lesiones en coanas

En las coanas, la evaluación a los 7 días post-desafío indicó a nivel de T1 presencia de aves con score 2 de lesión (presencia de placas diftéricas), mientras que las aves T4/control presentaron un score promedio de 1.5. Los valores más bajos de score de lesiones en coanas se observaron en las aves de T2 y T3 (promedio=0.5; mediana=0) (valores de medianas estadísticamente no significativos;

$p>0.05$). A los 11 días post-desafío similares grados de lesión se apreciaron en las aves de T1 y T2 (promedio=0.5; mediana=0.5), mientras que las aves T4/control presentaron valores ligeramente más altos (promedio=1; mediana=0.05). Las aves de T3 presentaron el menor grado de lesión (promedio=0.25; mediana=0). Al día 17 post-desafío no se observaron lesiones en las aves de T2 y T3, mientras que T1 y las aves T4/control presentaron lesiones en bajo grado (promedio=0.25; mediana=0) ($p>0.05$).

4.3.3. Mucosidad en tráquea

En relación a la presencia de mucus en la tráquea, los resultados de la evaluación al día 7 post-desafío indicaron similares valores de lesión en las aves T4/control y las aves de T1 (promedio=2.75; mediana=3, correspondiente a un severo exudado traqueal), mientras que las aves de T2 y T3 presentaron un menor grado de mucosidad en tráquea (promedio=0.5; mediana=0). No se demostró diferencia significativa entre tratamientos ($p>0.05$). A los 11 días post-desafío las aves control presentaron mayor grado de lesiones, aunque menores en comparación al día 7 (promedio=1.75; mediana=1.5 correspondiente a un exudado leve). Al día 17 post-desafío, T1 y T2 presentaron los scores más altos de mucosidad en tráquea (promedio=0.75; mediana=1 correspondiente a un leve exudado), comparado a las aves de T3 (promedio=0.5; mediana=0) y las aves T4/control (promedio=0.25; mediana=0). No obstante el análisis de Kruskal Wallis no demostró diferencias significativas ($p>0.05$).

4.3.4. Hemorragia en tráquea

En relación a la presencia de hemorragia en tráquea, durante la evaluación al día 7 post-desafío, las aves T4/control presentaron un mayor score de hemorragias (promedio=1.5; mediana=1 correspondiente a leve evidencia de petequias), seguido de los tratamientos T2 (promedio=1; mediana=0), T1 (promedio=0.75; mediana=1) y T3 (promedio=0.25; mediana=0). No se observaron diferencias significativas entre tratamientos ($p>0.05$). Al día 11 los score más altos de lesiones se

encontraron en las aves T4/control (promedio=1.25; mediana=1) y las aves de T1 (promedio=1.25; mediana=1.5), mientras que los valores más bajos se observaron en las aves de T3 (promedio=0.5; mediana=0.5), no observándose diferencias significativas entre tratamientos ($p>0.05$). Al día 17 post-desafío únicamente las aves de T1 presentaron un valor inferior de score de lesiones (promedio=0.5; mediana=0), mientras que no se observaron lesiones hemorrágicas en las aves de los otros tratamientos.

4.3.5. Sacos aéreos

La evaluación del score de lesiones en sacos aéreos al día 7 post-desafío indicó los valores más altos en las aves de T1 (promedio=3; mediana=3 correspondiente a aerosaculitis con material caseoso) y las aves T4/control (promedio=3; mediana=1), no se observaron lesiones en las aves de T3, mientras que T2 presentó un score muy bajo de lesiones (promedio=0.25; mediana=0), demostrándose además diferencias significativas entre los tratamientos T1 y T2 y entre T1 y T3 ($p<0.05$). Al día 11 post-desafío se encontraron lesiones en bajo grado en las aves de T1 (promedio=1; mediana=1 correspondiente a aerosaculitis con material espumoso), las aves T4/control (promedio=1; mediana=1) y las aves de T2 (promedio=1; mediana=0.5). No se observaron lesiones aparentes en las aves de T3 y no se demostró diferencias significativas entre tratamientos ($p>0.05$). Al día 17, no se presentaron lesiones en sacos aéreos de las aves.

V. DISCUSIÓN

La LTI es una enfermedad de gran impacto en la industria avícola a nivel mundial. Es por ello que en la actualidad se realizan diferentes esfuerzos con la finalidad de controlar la infección en la industria avícola. El objetivo del presente estudio fue evaluar la protección conferida por una vacuna inactivada contra LTI utilizada en tres diferentes programas de vacunación, referente a la evaluación de signos clínicos y lesiones macroscópicas en pollos de carne infectados experimentalmente con cepas de campo.

En relación a la evaluación de los signos clínicos tomamos como uno de los indicadores de mayor importancia a la presencia de ronqueras, signo clínico comúnmente descrito por varios autores (Humbert *et al.*, 2002). A partir de nuestros resultados, la ronquera se presentó en una frecuencia no menospreciable a partir del día 4 post-desafío, lo cual es acorde con otros estudios experimentales como el de Fuchs *et al.* (2007) quienes indican que la aparición de signos de ronquera ocurre tan pronto como a los dos días post-desafío. Los resultados de la evaluación de ronqueras fueron variables durante los 4 a 8 primeros días post-desafío; a partir del día 10 hasta el día 14 post-desafío las aves de los grupos vacunales presentaron menores frecuencias de ronqueras en comparación a las aves control, observándose una mejor protección en las aves T3 que recibieron doble vacunación, lo

cual indicaría que con el uso de una vacuna inactivada es necesaria la doble inmunización para alcanzar un grado de protección adecuado.

La evaluación de otros signos clínicos como estornudos y conjuntivitis presentaron un comportamiento similar a la evaluación de ronqueras, siendo las aves control las que presentaron las frecuencias más altas, mientras las aves de T3 presentaron las menores frecuencias, e incluso dejaron de presentar estos signos clínicos a final de campaña, lo que demuestra la importancia de la inclusión de dos rondas vacunales con el uso de vacunas inactivadas.

De forma general, durante el experimento todas las aves presentaron un grado moderado de desarrollo de la enfermedad, lo cual es similar a estudios desarrollados anteriormente (Brandao y Chacón, 2009; Guy y García, 2008). No obstante debemos considerar que en general las aves presentaron signos clínicos de forma moderada, a diferencia de la presentación clínica de la enfermedad en condiciones de campo donde la enfermedad se caracteriza por la presencia constante de disnea, tos, ronquidos y expectoración sanguinolenta (Linares *et al.*, 1994). A nivel de la industria la crianza de aves, con una densidad poblacional alta, en pisos de tierra y con factores de estrés constante conllevan a un desarrollo de la enfermedad más agudo que bajo condiciones experimentales (Kirkpatrick, 2006).

LTI es una enfermedad reconocida por las lesiones que ocasionan a nivel del tracto respiratorio superior, por tales motivos se realizó la evaluación de las lesiones macroscópicas post-mortem. En relación a la evaluación macroscópica de la laringe no se observó lesión alguna al día 7 post-desafío, mientras que al día 11 post-desafío el score más alto de lesiones se observó en las aves control, mientras que los menores niveles de score de lesiones se observó en las aves de T3. A partir de estos resultados podemos observar que los programas vacunales no evitan el desarrollo clínico de la enfermedad, pero controlan la severidad de la infección. Por otro lado, en relación a la evaluación de mucus y hemorragia en la tráquea podemos apreciar que durante los días de evaluación se observaron lesiones en baja magnitud en las aves, desapareciendo las lesiones al día 17 post-desafío.

Los mejores niveles de protección en función a la evaluación de la tráquea demuestran que las aves con doble inmunización presentan mejores resultados. Estudios de inmunización han demostrado sustancial producción de inmunoglobulinas IgG e IgA a nivel de tráquea (Santander, 2010) por lo cual las aves con doble inmunización están más protegidas.

Debemos considerar que en comparación del sistema de clasificación de Devlin *et al.* (2007), el cual únicamente incluyen la presencia de mucus y hemorragias en tráquea, existen además otras manifestaciones macroscópicas o combinaciones de manifestaciones que deben ser tomadas en consideración. Estas manifestaciones pueden ser consecuencia además de complicaciones secundarias por bacterias como por ejemplo *E. coli*, el cual incluso puede alcanzar pulmones como ha sido demostrado por Bagust & Johnson (1995). En nuestro estudio, únicamente al día 7 post-desafío se observaron lesiones en sacos aéreos de grado 3 (presencia de material caseoso) lo cual podría indicar la presencia de infecciones secundarias y demuestra que una ronda de protección no es efectiva en el control del LTI. Posteriormente no se observaron alteraciones en mayor grado en todas las aves durante los días 11 y 17 post-desafío.

En relación a los parámetros productivos, los resultados de la evaluación de peso corporal y ganancia de peso no demostraron diferencias significativas, no obstante al final de campaña las aves de T1 presentaron los mayores pesos así como las aves control. Una posible explicación para menores pesos en los tratamientos T2 y T3 en comparación a las aves control indicaría que un mayor gasto de energía va destinado a la estimulación y desarrollo del sistema inmune mediante las vacunaciones que para la ganancia de peso. No obstante, la observación de las ganancias de pesos demostró tendencias más altas en los grupos vacunales en comparación a las aves control.

Hoy en día se buscan nuevas alternativas para el control de LTI mediante vacunación. El uso de vacunas convencionales mediante virus atenuados tiene inconvenientes relacionados a la

patogenicidad residual y la reversión a la virulencia, ocasionando la aparición de signos clínicos indistinguible de la enfermedad ocasionada por virus de campo (Dekich, 1998). De forma práctica, se ha asumido que la gran mayoría de virus detectados en campo están relacionados con virus vacunales. Es bien sabido que algunos virus vacunales son capaces de revertir a la virulencia por lo que debe prestarse atención a los métodos de vacunación para evitar la aparición de reversión (Zavala, 2008).

Actualmente se están desarrollando una nueva generación de vacunas contra LTI como por ejemplo vacunas vectorizadas, vacunas con genes anulados y vacunas con inmunomoduladores, no obstante aún falta demostrar su eficacia real bajo condiciones de campo. Por lo tanto, a partir de los resultados obtenidos en nuestro estudio sugerimos que el uso de vacunas inactivadas mediante dos rondas de vacunación constituye una alternativa para el control de LTI en crianza de aves.

VI. CONCLUSIONES

- La vacuna inactivada oleosa redujo alrededor de un 50% la severidad de las manifestaciones clínicas y lesiones macroscópicas, en comparación con las aves sin vacunar.
- Se obtuvo aparentemente una mejor protección en las aves vacunadas al día 1 y al día 12 de edad (disminuyendo aproximadamente un 60% de signos clínicos y lesiones post-desafío).
- La vacunación de una sola dosis al primer día no protegió a las aves siendo similar al grupo control.
- La vacunación de una sola dosis al día 12 de edad redujo aproximadamente un 40% las manifestaciones clínicas y lesiones macroscópicas.

VII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. **Abbas F, Andreasen JR, Jackwood M. 1996.** Development of a Polymerase chain reaction and a nonradioactive DNA probe for Infectious laryngotracheitis virus. *Avian Dis.* 40: 56-62.
2. **Alexander HS, Key DW, Nagy E. 1998.** Analysis of Infectious laryngotracheitis virus isolates from Ontario and New Brunswick by the Polymerase chain reaction. *Can. J. Vet. Res.* 62: 68-71.
3. **Barhoom S, Forgacs A y Solyom F. 1986.** Development of an inactivated vaccine against infectious laryngotracheitis (ILT) – serological and protection studies. *Avian Pathology* 15: 213-221.
4. **Bagust TJ, Johnson MA. 1995.** Avian infectious laryngotracheitis: virus-host interactions in relation to prospects for eradication. *Avian Pathology* 24: 373-391.
5. **Brandao PE, Chacón JL. 2009.** Laringotraqueíte infecciosa. In: Revolledo L, Piantino AJ, eds. *Patología Aviária*. Ed. Manole. Sao Paulo, Brasil. p 276-281.
6. **Calnek BW. 2000.** Laringotraqueitis Infecciosa. *Enfermedades de aves*. 2ª Ed. p 539-553.
7. **Carter GR, Wise DJ, Flores EF. 2006.** Herpesviridae. En: A concise review of veterinary virology. International Veterinary Information Service, Ithaca NY. [Internet], [27 Febrero 2010] Disponible online en: <http://www.avis.org/docarchive/A3411.0506.ES.pdf>

8. **Chacón JL, Piantino A. 2009.** Diagnóstico de la Laringotraqueitis infecciosa de las aves y caracterización viral. [Internet], [27 Febrero 2010] Disponible online en: <http://www.aves.pe2.us/2009/08/diagnostico-de-la-laringotraqueitis.html>
9. **Chacón JL. 2005.** Vírus da laringotraqueíte infecciosa: detecção e caracterização molecular, isolamento, diagnóstico diferencial e epidemiologia de um surto em granjas de poedeiras comerciais na região de Bastos, Estado de São Paulo. Tesis Maestría Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidade de São Paulo. 116 p.
10. **Crespo R, Woolcock PR, Chin RP, Shivaprasad HL, García M. 2007.** Comparison of diagnostics techniques in an outbreak of infectious laryngotracheitis from meat chickens. *Avian Diseases* 51: 858-862.
11. **Dekich MA. 1998.** Broiler industry strategies for control of respiratory and enteric diseases. *Poultry Science* 77: 1176-1180.
12. **Devlin JM, Browning GF, Gilkerson JR, Fenton SP, Hartley CA. 2008.** Comparison of the safety and protective efficacy of vaccination with glycoprotein-G-deficient infectious laryngotracheitis virus delivered via eye-drop, drinking water or aerosol. *Avian Pathology* 37 (1): 83-88.
13. **Devlin JM, Browning GF, Hartley CA, Gilkerson JR. 2007.** Glycoprotein G deficient infectious laryngotracheitis virus is a candidate attenuated vaccine. *Vaccine* 25: 3561–3566.
14. **Devlin JM, Browning GF, Hartley CA, Kirkpatrick NC, Mahmoudian A, Noormohammadi AH, Gilkerson JR. 2006.** Glycoprotein G is a virulence factor in infectious laryngotracheitis virus. *Journal of General Virology* 87: 2839-2847.
15. **Dufour-Zavala L, Zavala G. 2007.** Control de la Laringotraqueítis vacunal. *Industria Avícola* 54 (12): 30-31.
16. **Dufour-Zavala L. 2008.** Epizootiology of infectious laryngotracheitis and presentation of an industry control program. *Avian Diseases* 52: 1-7.

17. **Fahey KJ, York JJ. 1990.** The role of mucosal antibody in immunity to infectious laryngotracheitis virus in chickens. *Journal of General Virology* 71: 2401-2405.
18. **Fernández M. 2009.** Uso de vacunas oleosas contra la Laringotraqueítis infecciosa. *Farvet al día* 2: 6-9.
19. **Fuchs W, Veits J, Helferich D, Granzow H, Teifke JP, Mettenleiter TC. 2007.** Molecular biology of avian infectious laryngotracheitis virus. *Vet. Res.* 38: 261-279.
20. **Gerlach H. 1994.** Viruses. En: Ritchie BW, Harrison GJ, Harrison LR, Eds. *Avian Medicine: Principles and Application*. Wingers Publishing, Inc. Florida. p 874-876.
21. **Gibert M. 2010.** Detección y caracterización de aislados de *Escherichia coli* de origen clínico y fecal en gallinas ponedoras. Tesis Doctoral. Madrid: Universidad Complutense de Madrid. p 10.
22. **Guy JS, García M. 2008.** Laryngotracheitis. In: Saif YM, Barnes HJ, Glisson JR, Fadly AM, McDougald LR, Swayne DE, eds. *Diseases of poultry*. 12 th ed. Iowa, USA: Iowa State University Press. p 137-152.
23. **Guy JS, Barnes HJ, Morgan LM. 1990.** Virulence of infectious laryngotracheitis viruses: comparison of modified-live vaccine viruses and North Carolina field isolates. *Avian Diseases* 34: 106-113.
24. **Han MG, Kim SJ. 2003.** Efficacy of live virus vaccines against infectious laryngotracheitis assessed by polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism. *Avian Diseases* 47: 261-271.
25. **Hidalgo H. 2003.** Infectious laryngotracheitis: a review. *Brazilian Journal of Poultry Science* 5 (3): 157-168.
26. **Hughes CS, Jones RC. 1988.** Comparison of cultural methods for primary isolation of infectious laryngotracheitis virus from field material. *Avian Pathology*. 17: 295-303.
27. **Humbert J, García M, Riblet SM, Resurreccion RS, Brown TP. 2002.** Detection of infectious laryngotracheitis virus in formalin-fixed, paraffin-embedded tissues by nested polymerase chain reaction. *Avian Diseases* 46: 64-74.

28. **Kaleta EF. 1990.** Herpesviruses of birds – a review. *Avian Pathology* 19: 193-211.
29. **Kirkpatrick NC, Mahmoudian A, Colson CA, Devlin JM, Noormohammadi AH. 2006.** Relationship between mortality, clinical signs and tracheal pathology in infectious laryngotracheitis. *Avian Pathology* 35 (6): 449-453.
30. **Matthews REF. 1984.** Clasificación y nomenclatura de los virus. Cuarto informe del comité internacional de taxonomía de virus. SEM, Madrid. p. 50-55.
31. **Nakamura K, Imai K, Tanimura N. 1996.** Comparison of the effects of infectious bronchitis and infectious laryngotracheitis on the chicken respiratory tract. *J Comp Path* 114: 11-21.
32. **Negrete M. 2009.** Laringotraqueitis infecciosa: la experiencia peruana. [Internet], [27 de Febrero 2010] Disponible en: [http://www.amevea-ecuador.org/datos/LARINGOTRAQUEITIS%20INFECCIOSA %20LA%20EXPERIENCIA%20PERUANA.pdf](http://www.amevea-ecuador.org/datos/LARINGOTRAQUEITIS%20INFECCIOSA%20LA%20EXPERIENCIA%20PERUANA.pdf)
33. **Leong VY, Glisson JR, Resurreccion RS, Cheng IH. 1994.** Infectious laryngotracheitis virus in commercial hens: a serological study based on enzyme-linked immunosorbent assay. *Avian Dis.* 38:304-307.
34. **Linares JA, Bickford AA, Cooper GL, Charlton BR, Woolcock PR. 1994.** An outbreak of infectious laryngotracheitis in California broilers. *Avian Diseases* 38:188-192.
35. **Lozano F. 2010.** Prevalencia de laringotraqueitis y medidas de control en Latinoamérica. En: *Memorias de LTI.* Lima, Perú. p 19-27.
36. **Loudovaris T, Yoo BH, Fahey KJ. 1991.** Genetic resistance to infectious laryngotracheitis in inbred lines of White Leghorn chickens. *Avian Pathology* 20: 357-361.
37. **[OIE] Oficina Internacional de Epizootias. 2008.** Avian infectious laryngotracheitis. Capítulo 2.3.3. OIE Terrestrial Manual. P 456-463.
38. **Piñol J, Querol E, Serra X. 2004.** Expresión de la Glicoproteína E del BoHV-1 en *Escherichia coli*. Determinación de una secuencia citotóxica. Tesis grado de Doctor Ciencias Biológicas. Universidad Autónoma de Barcelona. p 69.

39. **Rautenschlein S, Yeh HY, Njenga MK, Sharma JM. 2002.** Role of intrabursal T cells in infectious bursal disease virus (IBDV) infection: T cells promote viral clearance but delay follicular recovery. *Arch. Virol.* 147: 285–304.
40. **Reese S, Dalamani G, Kaspers B. 2006.** The avian lung-associated immune system: a review. *Vet. Res.* 37: 311–324.
41. **Rodríguez-Avila A, Oldoni I, Riblet S, García M. 2007.** Replication and transmission of a live attenuated infectious laryngotracheitis virus (ILTV) vaccines. *Avian Diseases* 51: 905-911.
42. **Santander MJ. 2010.** Manual para la atención de focus de Laringotraqueitis Infecciosa aviar en zona suroccidental del valle del Cauca. Universidad del Tolima Especialización Avicultura 2010. [Internet], [03 de febrero del 2011] Disponible en: <http://www.solla.com/PDF/manual-para-manejo-de-focos-de-la-laringotraqueitis.pdf>
43. **Salas M. 2008.** Método de diagnóstico para laringotraqueitis infecciosa aviar. Sistema de Revisiones en Investigación Veterinaria de San Marcos. Lima, 12 p.
44. **Schnitzlein WM, Radzevicius J, Tripathy DN. 1994.** Propagation of infectious laryngotracheitis virus in an avian liver cell line. *Avian Dis.* 38: 211-227.
45. **[SENASA] Servicio Nacional de Sanidad Agraria. 2010.** Enfermedad de laringotraqueitis infecciosa aviar. [Internet], [10 de Marzo 2010] Disponible en: http://www.senasa.gob.pe/0/modulos/JER/JER_Interna.aspx?ARE=0&PFL=1&JER=258
46. **[SENASA] Servicio Nacional de Sanidad y Calidad Agroalimentaria. 2009.** Manual para la prevención y el control de brotes de laringotraqueitis infecciosa aviar. Dirección Nacional de Sanidad Animal. [Internet], [27 de Febrero 2010] Disponible en: <http://www.senasa.gov.ar>
47. **Sellers HS, García M, Glisson JR, Brown TP, Sander JS, Guy JS. 2004.** Mild infectious laryngotracheitis in broilers in the Southeast. *Avian Diseases* 48: 430-436.
48. **Shane SM. 2005.** Handbook of Poultry Diseases. 2da Ed. American Soybean Association, Singapore. p 84-86.

49. **Sun HL, Wang YF, Tong GZ, Zhang PJ, Miao DY, Zhi HD, Wang M, Wang M. 2008.** Protection of chickens from Newcastle Disease and infectious laryngotracheitis with a recombinant fowlpox virus co-expressing the F, HN genes of Newcastle Disease virus and gB gene of infectious laryngotracheitis virus. *Avian Diseases* 52: 111-117.
50. **Swayne D, Lee C, Spackman E. 2006.** Inactivated North American and European H5N2 avian influenza virus vaccines protect chickens from Asian H5N1 high pathogenicity avian influenza virus. *Avian Pathol.* 35: 141–146.
51. **Tizard I. 1998.** *Inmunología Veterinaria*. 5ª ed. México: McGraw-Hill Interamericana. p 285-304.
52. **Tong GZ, Zhang SJ, Meng SS, Wang L, Qiu HJ, Wang YF, Yu L, Wang M. 2001.** Protection of chickens from infectious laryngotracheitis with a recombinant fowlpox virus expressing glycoprotein B of infectious laryngotracheitis virus. *Avian Pathology* 30: 143-148.
53. **Vagnozzi A, Zavala G, Riblet SM, Mundt A, García M. 2012.** Protection induced by commercially available live-attenuated and recombinant viral vector vaccines against infectious laryngotracheitis virus in broiler chickens. *Avian Pathology* 41: 21-31.
54. **Veits J, Köllner B, Teifke JP, Granzow H, Mettenleiter TC, Fuchs W. 2003.** Isolation and characterization of monoclonal antibodies against structural proteins of infectious laryngotracheitis virus. *Avian Diseases* 47: 330-342.
55. **Villegas P. 1998.** Viral diseases of the respiratory system. *Poultry Science* 77: 1143-1145.
56. **Williams RA, Bennet M, Bradbury JM, Gaskell RM, Jones RC, Jordan FTW. 1992.** Demonstration of sites of latency of infectious laryngotracheitis virus using the polymerase chain reaction. *Journal of General Virology* 73: 2415-2420.
57. **Yauris G, Icochea E, González R, Falcón N. 2008.** Evidencia serológica de anticuerpos contra el virus de la laringotraqueitis infecciosa aviar en gallinas reproductoras de carne y postura. *Rev Inv Vet Perú* 19 (2): 183-186.

58. **Yauris G. 2005.** Evidencia serológica de anticuerpos contra el virus de la laringotraqueitis Infecciosa Aviar en gallinas reproductoras de carne y postura. Tesis de Médico Veterinario. Lima: Universidad Nacional Mayor de San Marcos 52p.
59. **Zavala G. 2008.** Actualización en Laringotraqueítis infecciosa. [Internet], [27 Febrero 2010] Disponible online en: [http://www.cadenaavicola.com.ar/Adjuntos/AMEVEA2008/ACTUALIZACION%20EN%20LARINGOTRAQUEITIS%20%20ZAVALA%202008%20\(WORD%202003\).doc](http://www.cadenaavicola.com.ar/Adjuntos/AMEVEA2008/ACTUALIZACION%20EN%20LARINGOTRAQUEITIS%20%20ZAVALA%202008%20(WORD%202003).doc).

VIII. APÉNDICE

Apéndice I. Valores estadísticos (promedio, medianas) en aves durante las semanas de estudio

PARAMETROS PRODUCTIVOS	TRATAMIENTOS							
	T1		T2		T3		T4/Control	
	Promedio	Sd	Promedio	Sd	Promedio	Sd	Promedio	Sd
Peso corporal								
Semana 1	142.10	1.60	133.07	3.16	144.37	2.54	146.47	2.49
Semana 2	362.67	14.64	353.00	7.94	367.33	5.51	380.00	7.21
Semana 3	899.00	44.17	856.67	26.58	886.67	14.57	940.67	13.61
Semana 4	1267.33	42.02	1230.33	18.90	1248.00	22.91	1325.00	19.16
Semana 5	1995.33	78.00	1817.67	35.57	1839.33	34.50	2043.33	17.62
Semana 6	2406.00	149.16	2206.67	45.08	2192.33	89.69	2396.33	49.14
Ganancia de peso semanal								
Semana 1	14.63	0.25	13.50	0.52	14.93	0.32	15.30	0.26
Semana 2	31.67	1.53	31.33	1.15	31.67	0.58	33.33	0.58
Semana 3	76.67	4.73	72.00	4.36	74.33	1.53	80.00	1.00
Semana 4	52.67	2.89	53.33	1.53	51.67	1.53	54.67	2.08
Semana 5	104.00	9.54	84.00	3.00	84.33	4.73	102.67	0.58
Semana 6	58.67	10.97	55.67	7.57	50.67	8.50	50.33	5.86

Apéndice II. Presentación de ronqueras en aves post-desafío viral

FRECUENCIA		TRATAMIENTOS						
RONQUERA	T1		T2		T3		T4/CONTROL	
Días de evaluación	Positivos/total aves	%	Positivos/total aves	%	Positivos/total de aves	%	Positivos/total aves	%
Día 4	21/45	46.67	11/45	24.44	5/45	11.11	31/45	68.89
Día 6	29/45	64.44	21/45	46.67	11/45	24.44	26/45	57.78
Día 8	24/41	58.54	18/41	43.90	8/41	19.51	23/41	56.10
Día 10	21/41	51.22	13/41	31.71	4/41	9.76	22/41	53.66
Día 12	17/37	45.95	8/37	21.62	0/37	0.00	20/37	54.05
Día 14	10/37	27.03	3/37	8.11	0/37	0.00	18/37	48.65

Apéndice III. Presentación de estornudos en aves post-desafío viral

FRECUENCIA			TRATAMIENTOS					
ESTORNUDOS	T1		T2		T3		T4/CONTROL	
Días de evaluación	Positivos/total aves	%	Positivos/total aves	%	Positivos/total aves	%	Positivos/total aves	%
Día 4	2/45	4.44	10/45	22.22	10/45	22.22	8/45	17.78
Día 6	5/45	11.11	3/45	6.67	3/45	6.67	11/45	24.44
Día 8	5/41	12.20	2/41	4.88	0/41	0.00	10/41	24.39
Día 10	3/41	7.32	1/41	2.44	0/41	0.00	9/41	21.95
Día 12	3/39	7.69	0/37	0.00	0/37	0.00	4/37	10.81
Día 14	0/39	0.00	0/37	0.00	0/37	0.00	1/37	2.70

Apéndice IV. Presentación de conjuntivitis en aves post-desafío viral

FRECUENCIA		TRATAMIENTOS						
CONJUNTIVITIS	T1		T2		T3		T4/CONTROL	
Días de evaluación	Positivos/total aves	%	Positivos/total aves	%	Positivos/total aves	%	Positivos/total aves	%
Día 4	1/45	2.22	1/45	2.22	1/22	2.22	0/45	0.00
Día 6	0/45	0.00	0/45	0.00	0/45	0.00	5/45	11.11
Día 8	0/41	0.00	0/41	0.00	0/41	0.00	4/41	9.76
Día 10	0/41	0.00	0/41	0.00	0/41	0.00	2/41	4.88
Día 12	0/39	0.00	0/37	0.00	0/37	0.00	0/37	0.00
Día 14	0/39	0.00	0/37	0.00	0/37	0.00	0/37	0.00

Apéndice V. Presentación de score de lesiones en laringe de aves post-desafío viral

DÍA DE EVALUACIÓN	LESIONES EN LARINGE	TRATAMIENTOS			
		T1	T2	T3	T4/Control
Día 7	• Promedio	0	0	0	0
	• Mediana	0	0	0	0
	• Mínimo	0	0	0	0
	• Máximo	0	0	0	0
Día 11	• Promedio	0.5	0.75	0.25	1.5
	• Mediana	0	1	0	1.5
	• Mínimo	0	0	0	0
	• Máximo	2	1	1	3
Día 17	• Promedio	0.5	0.75	0	0.25
	• Mediana	0.5	0.5	0	0
	• Mínimo	0	0	0	0
	• Máximo	1	2	0	1

Apéndice VI. Presentación de score lesiones en las coanas de aves post-desafío viral

DÍA DE EVALUACIÓN	LESIONES EN COANAS	TRATAMIENTOS			
		T1	T2	T3	T4/Control
Día 7	• Promedio	2	0.5	0.5	1.5
	• Mediana	2	0	0	1.5
	• Mínimo	2	0	0	1
	• Máximo	2	2	2	2
Día 11	• Promedio	0.5	0.5	0.25	1
	• Mediana	0.5	0.5	0	0.5
	• Mínimo	0	0	0	0
	• Máximo	1	1	1	3
Día 17	• Promedio	0.25	0	0	0.25
	• Mediana	0	0	0	0
	• Mínimo	0	0	0	0
	• Máximo	1	0	0	1

Apéndice VII. Presentación del score de lesiones mucosas en tráquea en aves post-desafío viral

DÍA DE EVALUACIÓN	LESIONES MUCOSAS EN TRÁQUEA	TRATAMIENTOS			
		T1	T2	T3	T4/Control
Día 7	• Promedio	2.75	0.5	0.5	2.75
	• Mediana	3	0	0	3
	• Mínimo	2	0	0	2
	• Máximo	3	2	2	3
Día 11	• Promedio	1	1.25	0.35	1.75
	• Mediana	1	0.5	0	1.5
	• Mínimo	0	0	0	0
	• Máximo	2	4	1	4
Día 17	• Promedio	0.75	0.75	0.5	0.25
	• Mediana	1	1	0.5	0
	• Mínimo	0	0	0	0
	• Máximo	1	1	1	1

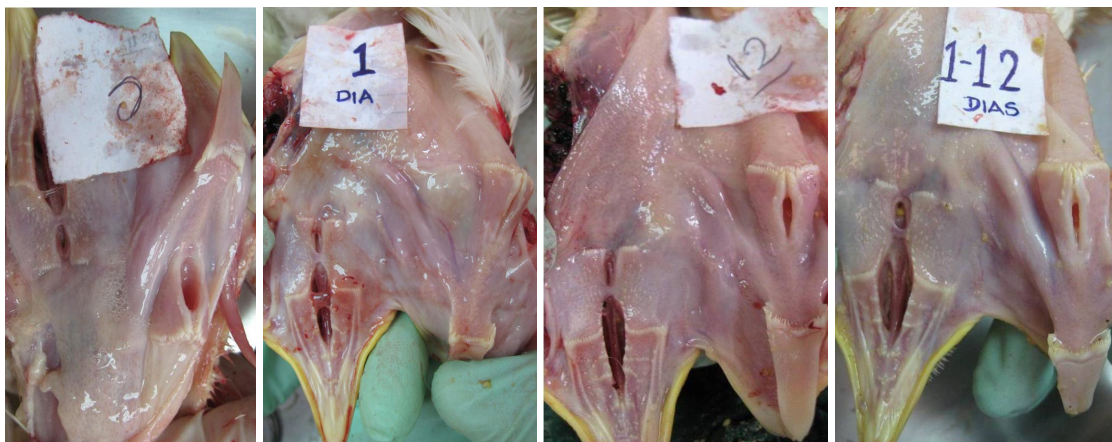
Apéndice VIII. Presentación de score de lesiones hemorrágicas en tráquea de aves post-desafío

DÍA DE EVALUACIÓN	LESIONES HEMORRÁGICAS EN TRÁQUEA	TRATAMIENTOS			
		T1	T2	T3	T4/Control
Día 7	• Promedio	0.75	1	0.25	1.5
	• Mediana	1	0	0	1
	• Mínimo	0	0	0	0
	• Máximo	1	4	1	4
Día 11	• Promedio	1.25	1	0.5	1.25
	• Mediana	1.5	1	0.5	1
	• Mínimo	0	0	0	0
	• Máximo	2	2	1	3
Día 17	• Promedio	0.5	0	0	0
	• Mediana	0	0	0	0
	• Mínimo	0	0	0	0
	• Máximo	2	0	0	0

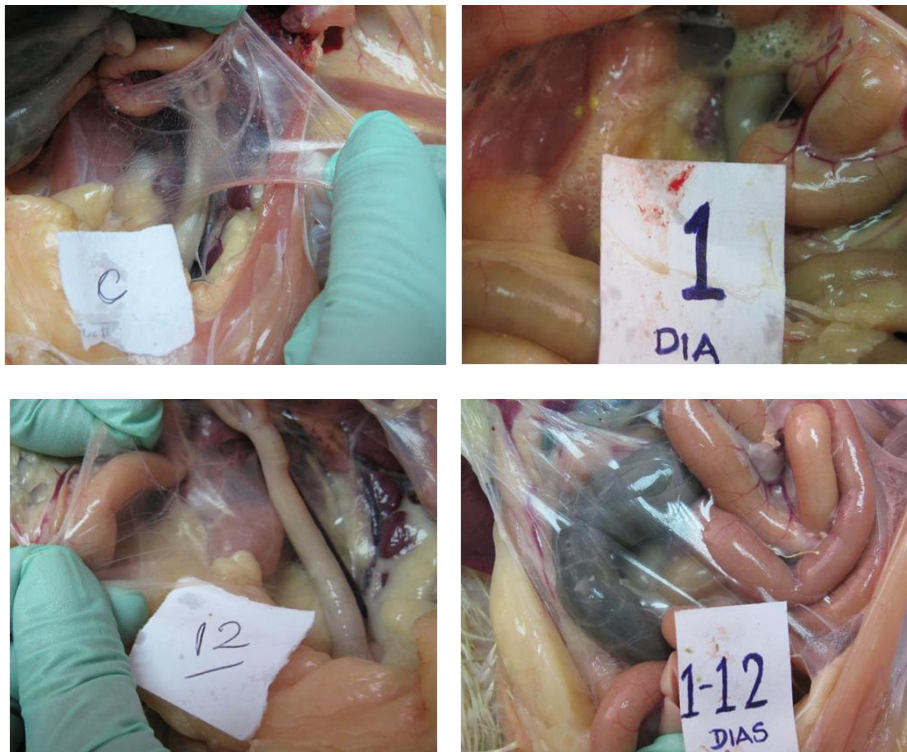
Apéndice IX. Presentación de score de lesiones en sacos aéreos de aves post-desafío viral

DÍA DE EVALUACIÓN	LESIONES EN SACOS AÉREOS	TRATAMIENTOS			
		T1	T2	T3	T4/Control
Día 7	• Promedio	3	0.25	0	3
	• Mediana	3	0	0	1
	• Mínimo	3	0	0	0
	• Máximo	3	1	0	2
Día 11	• Promedio	1	1	0	1
	• Mediana	1	0.5	0	1
	• Mínimo	0	0	0	1
	• Máximo	2	3	0	1
Día 17	• Promedio	0	0	0	0
	• Mediana	0	0	0	0
	• Mínimo	0	0	0	0
	• Máximo	0	0	0	0

Apéndice X. Evaluación del grado de mucosidad en aves T4/control (C) (superior izquierda), T1 (superior derecha), T2 (inferior izquierda) y T3 (inferior derecha).



Apéndice XI. Evaluación del grado de aerosaculitis en aves T4/control (C) (superior izquierda), T1 (superior derecha), T2 (inferior izquierda) y T3 (inferior derecha)



Apéndice XII. Evaluación de la mucosidad y hemorragias en las aves T4/control (superior izquierda), T1 (superior derecha), T2 (inferior izquierda) y T3 (inferior derecha)

